北京大学化学科学译丛 · 3

生物无机化学原理

〔美〕S. J. Lippard and J. M. Berg 著
席振峰 姚光庆 项斯芬 任宏伟 译

北京大学出版社

北京大学化学科学译丛-3

生物无机化学原理

〔美〕 S. J. Lippard and J. M. Berg 著
席振峰 姚光庆 项斯芬 任宏伟 译

北京大学出版社
北 京

著作权合同登记　图字：01-2000-1372

图书在版编目(CIP)数据

生物无机化学原理/(美)里帕得(Lippard，S. J.)，(美)伯格(Berg，J. M.)著；
席振峰等译，一北京：　北京大学出版社，2000. 6
(北京大学化学科学译丛：3)
书名原文：Principles of Bioinorganic Chemistry
ISBN 7-301-04503-4
Ⅰ. 生… Ⅱ. ① 里…② 伯…③ 席… Ⅲ. 生物化学：无机化学 Ⅳ. Q5
中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 61267 号

2P25/38 10

书　　名：生物无机化学原理
译作责任者：席振峰　姚光庆　项斯芬　任宏伟
责任编辑：赵学范
标准书号：ISBN 7-301-04503-4/O. 0463
出 版 者：北京大学出版社
地　　址：北京市海淀区中关村北京大学校内　100871
网　　址：http://cbs. pku. edu. cn
电　　话：出版部 62752015　发行部 62754140　编辑部 62752021
电子信箱：zpup@pup. pku. edu. cn
排 版 者：兴盛达激光照排中心
印 刷 者：中国科学院印刷厂
发 行 者：北京大学出版社
经 销 者：新华书店
　787 毫米×1092 毫米　16 开本　17. 5 印张　450 千字
　2000 年 6 月第 1 版　2000 年 6 月第 1 次印刷
定　　价：30. 00 元

内 容 简 介

本书译自美国 University Science Books（1994 年）出版的“Principles of Bioinorganic Chemistry”（Stephen J. Lippard 和 Jeremy M. Berg 著）。

全书约 45 万字，分成十三章，通过研究得较为透彻的实例，系统地阐明了生物无机化学的原理，依次讨论了生物无机化学概要；与生物无机研究有关的配位化学原理；生物分子的性质；生物无机化学研究中的物理方法；生物体内金属单元的选择、摄取和组装；细胞内金属离子浓度的控制与利用；金属离子折叠与生物分子的交联；金属离子和配合物与生物分子活性中心的结合；电子转移蛋白；底物结合与活化的非氧化还原机理；原子和基团的转移化学；金属性质对蛋白质特定功能的调控和生物无机化学的前沿问题。

本书可供综合性大学化学和生物化学专业作为研究生及本科生的教学用书或教学参考书，也可作为从事生物无机化学、生物化学、含金属药物合成化学、无机化学及配位化学的教学、科研工作人员的参考书。

译　序

在20世纪的最后几年里，人们就科学的未来发展趋势进行了多种多样的分析和讨论。其结论之一是，生命科学与化学结合，将在21世纪取得重大突破。应用于生物学的化学将成为最令人激动的科学前沿之一。化学与生物学的交叉学科中，生物无机化学是一个主导学科。这是因为生物体系中许多关键的过程都需要金属离子，并且生物无机化学在医学中的应用受到了人们的极大关注。20世纪70年代发展起来的这门新兴学科，现已积累了许多重要的发现和认识。我国部分高校已经开设了"生物无机化学"或类似的课程。

Stephen J. Lippard 和 Jeremy M. Berg 共著的"Principles of Bioinorganic Chemistry"，利用那些已研究得较为透彻的实例，系统地阐明了生物无机化学的原理，对于组织教学内容和开展有关研究工作具有很好的指导作用。本书是作者在著名的哥伦比亚大学(Columbia University)、麻省理工学院(Massachusetts Institute of Technology)以及约翰·霍普金斯大学(Johns Hopkins University)讲授"生物无机化学"课程的基础上发展而成的，某些章节已在美国若干院校试用过。我们希望这个中译本，能对我国在该领域的教学与科研有所贡献。

本书的第5、6、8、13章由席振峰翻译，第1、2、4章由姚光庆翻译，第9、10、11章由项斯芬翻译，第3、7、12章由任宏伟翻译。为了全书体例的统一，编辑对第4章中节的编号予以改动(取消原4.1节，本章的目的)。希望读者能对译本中的不当之处给予指出和更正。

在本书的翻译过程中，北京大学出版社本书的责任编辑赵学范老师给翻译工作的顺利进行提供了多方支持，在此深表感谢。

译　者

2000年元月

于北京大学

原　序

生物无机化学是化学和生物学的一个主导的交叉学科。许多关键的过程都需要金属离子，包括呼吸、大量的代谢、固氮、光合作用、发育、神经传递、肌肉收缩、信号传导、以及对毒剂和诱变剂的防护。非天然的金属已被引入人类生物学作为诊断的探针和药物。一旦发现更多的体系需要金属离子，许多生物无机化学的研究论文就扩大到那些曾经是发展前沿而现在已经成熟的领域。许多对生物无机体系卓越的研究，不仅深入洞察了单个的情况，而且把那些看似不相关的事实联系在一起，揭示了它们共同的本质。

本书试图通过使生物无机化学合乎逻辑和条理化的统一原理，来使该领域系统化。我们首先考虑那些对天然生物体有用的金属离子，为何大自然能选择它们，它们如何进入细胞，以及它们的浓度又是如何调节的。其次，我们讨论金属如何和生物高分子结合，金属的结合如何能使生物高分子折叠，导致具有功能，以及金属如何插入到它们的活性中心。最后，我们论述生物体系中金属离子的主要作用，诸如电子载体、结合和活化底物的中心、原子和基团的转移剂、以及作为核心单元或"生物无机芯片"，协调在特定的生物环境中起关键作用的功能。对上述每一个专题，我们首先确定基本原理，然后选择若干实例加以具体阐明，通常给出有关结构和机理的一致看法。注意力不仅集中在天然存在的金属离子上，同时也注意那些引入化学疗法，作为放射性药物或磁共振的显示剂，或那些必须限制其浓度以避免毒性抑或对环境有害的效应。因此，本书不仅对化学和生物界，即使对医学界也应具有同等的吸引力。

本书在内容上着重阐明原理，并辅以极其有限的经详细研究过的实例。通过对原理的阐述，本书有可能使讲授生物无机化学课程的教师用此教材作为组织框架，来运用他们手头现有的资料。至于那些未在现行课程中涵盖的材料，或对于新开设的课程或学生，希望研究其中某一专题，则可查阅每一章最后所列的原始文献。

本书是在 S. J. Lippard 于哥伦比亚大学(Columbia University)和麻省理工学院(Massachusetts Institute of Technology)及 J. M. Berg 于约翰·霍普金斯大学(Johns Hopkins University)所讲授的生物无机化学课程的基础上发展起来的。此外，某些章节已在定稿前经若干其他院校相应的课程试用过，每一章均得益于生物无机化学领域中一位或几位专家的审阅。本书试图在文字上润色，力求简洁，以适合不同的读者群体，并尽力减少书中的错误。

Walther Ellis，Robert Scott 和 Thomas Sorrell 分别阅读了全书，并给予批评指正。Ronald Breslow，John Caradonna，David Christianson，James Collman，Robert Hausinger，Kenneth Karlin，David Lavalee，George McLendon，Thomas O'Halloran，William Orme-Johnson，Lawrence Que Jr.，Wesley Sundquit 和 William Tolman 对个别章节提出过意见。我们对他们以及生物无机化学学会其他成员在完成此书中给予我们的帮助表示诚挚的感谢。需要强调的

是，本书存在的不足，则完全由我们俩人负责。

我们同样感谢许多 MIT 的学生，他们或对最后的书稿进行了校阅和订正，或花费了不计其数的时间来查寻插图和文献的出处，尤其是生物无机化学课程（编号为化学 5.067）的助教 Linda Doerrer，Petra Turowski 和 David Wright。由于他们以及本课程的学生，特别是 Lippard 研究组成员对本教材的仔细校阅，才使印刷错误得以降至最低，我们在此一并表示感谢。

蛋白质的带状图是借助 MOLSCRIPT（P. Kraulis，J. Appl. Crystallogr.，24，946（1991）.）完成的，我们感谢 Jeffrey Buchsbaum 帮助得到该程序并在 Johns Hopkins 付诸实施。我们还要特别感谢 Julie Croston，Kathleen Kolish，Colette，Laurencot，Marilyn Mason 和 Nancy Williams，他们无偿地帮助打印了原稿。最后，我们感谢出版人 Bruce Armbruster，是他确保了在可承受的价格下，制作出精美的书籍。我们也感谢 Audre Newman 和 Georg Klatt，他们付出了大量创造性的时间绘制了插图，不仅装点了原文而且提高了原文的质量。

Stephen J. Lippard

Jeremy M. Berg

目　录

第 1 章　生物无机化学概要 …… (1)
1.1　什么是生物无机化学 …… (1)
1.2　金属蛋白中的金属功能 …… (2)
1.2.a　双氧输运 …… (2)
1.2.b　电子转移 …… (4)
1.2.c　金属离子的结构作用 …… (6)
1.3　金属酶的功能 …… (6)
1.3.a　水解酶类 …… (7)
1.3.b　双电子氧化还原酶 …… (7)
1.3.c　多电子对氧化还原酶 …… (8)
1.3.d　重排 …… (8)
1.4　生物体中金属的信息传递作用 …… (9)
1.5　金属离子和核酸的相互作用 …… (9)
1.6　金属离子的输运和储存 …… (11)
1.7　医药中的金属 …… (11)
1.8　本书的内容安排 …… (11)
习题 …… (13)
参考文献 …… (13)
第 2 章　与生物无机研究有关的配位化学原理 …… (14)
2.1　热力学要点 …… (14)
2.1.a　软硬酸碱概念 …… (14)
2.1.b　螯合作用和 Irving-Williams 序列 …… (15)
2.1.c　配体的 pK_a 值 …… (15)
2.1.d　氧化还原电位的调节 …… (18)
2.1.e　生物高分子的作用 …… (19)
2.2　动力学要点 …… (19)
2.2.a　配体交换速率 …… (19)
2.2.b　取代反应 …… (20)
2.2.c　电子转移反应 …… (20)
2.3　生物体中金属离子的电子结构和几何结构 …… (21)
2.4　配合物中配体的反应性 …… (24)
2.5　模型配合物和自发自组装概念 …… (25)
习题 …… (26)
参考文献 …… (27)

第 3 章　生物分子的性质 …… (28)
3.1　蛋白质及其构成 …… (28)
3.1.a　天然存在的氨基酸 …… (28)
3.1.b　作为配体的蛋白质 …… (29)
3.1.c　蛋白质的结构 …… (30)
3.1.d　高度有序结构 …… (33)
3.1.e　基因克隆与表达对蛋白质的调控 …… (33)
3.1.f　酶反应的动力学分析 …… (35)
3.2　核酸及其构成 …… (37)
3.2.a　RNA、DNA 和它们的构件 …… (37)
3.2.b　RNA 结构 …… (37)
3.2.c　DNA 结构 …… (42)
3.2.d　金属结合与核酸结构 …… (42)
3.2.e　染色体的结构 …… (46)
3.2.f　体外的核酸合成 …… (47)
3.2.g　核酸分子中的硫原子 …… (47)
3.3　结合金属的其他生物分子 …… (47)
3.3.a　辅基 …… (47)
3.3.b　辅酶 B_{12} …… (48)
3.3.c　博莱霉素和铁载体 …… (48)
3.3.d　复杂的组装 …… (48)
习题 …… (50)
参考文献 …… (50)
第 4 章　生物无机化学研究中的物理方法 …… (52)
4.1　时标评述 …… (52)
4.2　X 射线方法 …… (53)
4.2.a　X 射线衍射 …… (53)
4.2.b　X 射线吸收光谱(XAS) …… (57)
4.3　磁共振方法 …… (58)
4.3.a　电子顺磁共振谱(EPR) …… (58)
4.3.b　核磁共振谱(NMR) …… (62)
4.4　穆斯鲍尔(Mössbauer)谱 …… (63)
4.5　电子光谱和振动光谱 …… (65)
4.5.a　电子光谱 …… (65)
4.5.b　振动光谱 …… (66)
4.5.c　圆二色性(CD)和磁圆二色性谱(MCD) …… (66)
4.6　磁性测量 …… (67)
4.7　还原电位测定 …… (68)
4.8　电子显微探针分析 …… (68)

习题 …… (68)
参考文献 …… (69)
第5章 生物体内金属单元的选择、摄取和组装 …… (71)
5.1 金属离子的生物利用率 …… (72)
5.2 低丰度金属的富集策略和细胞内化学 …… (77)
5.3 金属簇的自发自组装 …… (79)
5.3.a 铁-硫簇合物 …… (79)
5.3.b 多铁氧合簇和生物矿化作用 …… (87)
5.4 特定结构单元 …… (90)
5.4.a 卟啉 …… (90)
5.4.b 咕啉和氢化卟啉 …… (91)
5.4.c 金属核苷酸配合物 …… (91)
5.4.d 钼结合辅因子 …… (91)
习题 …… (94)
参考文献 …… (94)
第6章 细胞内金属离子浓度的控制与利用 …… (96)
6.1 金属离子的有益作用和毒性效应 …… (96)
6.2 在严格调节之下的有益金属:铁 …… (98)
6.2.a 溶解、摄取和传输 …… (98)
6.2.b 摄取和储存的金属调节 …… (100)
6.3 毒性金属实例:汞 …… (103)
6.3.a 涉及汞解毒过程的酶 …… (103)
6.3.b 汞解毒基因的金属调节 …… (104)
6.4 金属离子浓度梯度的产生和应用 …… (105)
6.4.a 离子梯度的产生 …… (106)
6.4.b 通过离子通道进行的离子传输 …… (107)
6.4.c 乙酰胆碱受体 …… (108)
6.4.d 电压调控钠通道 …… (112)
6.4.e 离子通道的合成模型 …… (115)
6.5 金属药物分布的组织选择性 …… (116)
习题 …… (117)
参考文献 …… (118)
第7章 金属离子在生物分子折叠和交联中的作用 …… (120)
7.1 蛋白结构中金属离子的稳定作用 …… (120)
7.1.a 天冬氨酸氨甲酰基转移酶 …… (120)
7.1.b 核酸结合蛋白中的锌结构域 …… (122)
7.1.c 钙结合蛋白:结构互变稳定作用 …… (127)
7.2 金属离子对核酸结构的稳定作用 …… (132)
7.2.a 转运 RNA …… (132)

7.2.b RNA 分子的催化活性 …… (133)
7.2.c 端粒 …… (134)
7.3 蛋白质连接到金属结合的 DNA 上 …… (135)
7.3.a 顺铂抗癌药物对 DNA 的解旋和弯曲作用 …… (135)
7.3.b 高迁移率(HMG)蛋白对含顺铂链内 d(GpG)或 d(ApG)交联 DNA 的识别和结合作用 …… (138)
7.4 作为构象探针的金属组装结构 …… (141)
7.4.a 金属嵌入物 …… (142)
7.4.b 构象识别 …… (142)
习题 …… (143)
参考文献 …… (144)
第 8 章 金属离子和配合物与生物分子活性中心的结合 …… (146)
8.1 金属离子对蛋白质位置的选择和插入 …… (146)
8.1.a 热力学控制 …… (146)
8.1.b 动力学控制 …… (148)
8.1.c 生物利用率 …… (149)
8.2 电中性的保持 …… (149)
8.2.a 单核点 …… (150)
8.2.b 多核点 …… (150)
8.3 金属离子和金属配合物与核酸的结合 …… (151)
8.4 生物高分子促进的金属-配体的相互作用 …… (153)
8.4.a 亚铁螯合酶 …… (153)
8.4.b DNA 促进的反应化学 …… (156)
习题 …… (156)
参考文献 …… (157)
第 9 章 电子转移蛋白 …… (158)
9.1 电子载体 …… (158)
9.1.a 铁-硫蛋白 …… (158)
9.1.b 蓝铜蛋白 …… (162)
9.1.c 细胞色素 …… (165)
9.2 远程电子转移 …… (166)
9.3 电子转移与距离及驱动力的相关性 …… (168)
习题 …… (172)
参考文献 …… (172)
第 10 章 底物结合与活化的非氧化还原机理 …… (174)
10.1 水解酶 …… (175)
10.1.a 羧肽酶 A 和嗜热菌蛋白酶:结构研究 …… (175)
10.1.b 羧肽酶 A:金属取代和波谱 …… (176)
10.1.c 动力学研究和酶机理假设 …… (178)

10.1.d 碱性磷酸酶 …… (180)
10.2 裂解酶:碳酸酐酶 …… (182)
10.3 氧化还原酶:醇脱氢酶 …… (184)
10.4 核苷酸活化作用 …… (187)
习题 …… (189)
参考文献 …… (189)
第 11 章 原子和基团的转移化学 …… (191)
11.1 双氧输运 …… (192)
11.1.a 血红蛋白和肌红蛋白 …… (192)
11.1.b 蚯蚓血红蛋白 …… (196)
11.1.c 血蓝蛋白 …… (200)
11.2 氧原子转移反应:Fe …… (204)
11.2.a 细胞色素 P-450 …… (204)
11.2.b 甲烷单加氧酶 …… (209)
11.2.c 儿茶酚和其他双加氧酶 …… (212)
11.3 氧原子转移反应:Mo …… (214)
11.3.a 钼氧转移酶 …… (214)
11.3.b 钼氧转移酶的模型 …… (217)
11.4 双氧的其他反应和副产物 …… (218)
11.4.a 保护性的金属酶:Cu-Zn 超氧化物歧化酶 …… (218)
11.4.b 保护性的金属酶:过氧化氢酶和过氧化物酶 …… (221)
11.4.c 产生双氧自由基的体系 …… (224)
11.5 与辅酶 B_{12} 相关的反应 …… (226)
11.5.a 历史的回顾 …… (226)
11.5.b 酶催化反应和催化机理 …… (226)
11.5.c 酶作用中的热力学因素 …… (229)
习题 …… (231)
参考文献 …… (231)
第 12 章 金属性质对蛋白质特定功能的调控 …… (235)
12.1 基本概念 …… (235)
12.2 蛋白质侧链对功能的调控:开放配位位点 …… (236)
12.2.a 血红蛋白 …… (236)
12.2.b 铁-硫蛋白(顺)乌头酸酶 …… (236)
12.2.c 锌蛋白 …… (239)
12.3 配体类型对功能的调控 …… (239)
12.3.a 血红蛋白 …… (239)
12.3.b 铁-硫蛋白:Rieske 中心 …… (241)
12.4 配位位点几何构型对功能的调控:铜蓝蛋白 …… (242)

12.5 间接因素对功能的调控 …… (243)
12.5.a $[Fe_4S_4(Cys)_4]$中心:疏水性与氢键作用 …… (243)
12.5.b 细胞色素中的静电势 …… (244)
12.6 底物特异性 …… (245)
12.6.a 蛋白酶 …… (245)
12.6.b 细胞色素 P-450 …… (246)
12.7 偶合过程 …… (248)
12.7.a 电子转移偶合:亚硫酸盐氧化酶 …… (248)
12.7.b 化学变化和电子转移偶合:固氮酶 …… (248)
12.7.c 底物结合:细胞色素 P-450 …… (249)
12.7.d 膜转移:光合反应中心 …… (252)
习题 …… (252)
参考文献 …… (253)
第 13 章 生物无机化学前沿 …… (255)
13.1 金属离子的选择与摄取 …… (256)
13.2 金属离子浓度的控制与应用 …… (256)
13.3 金属与生物分子的折叠和交联 …… (257)
13.4 金属离子与生物分子的结合 …… (258)
13.5 电子转移蛋白 …… (258)
13.6 底物的结合与活化 …… (258)
13.7 原子和基团的转移化学 …… (259)
13.8 活性位置的蛋白质调控 …… (260)
习题 …… (261)
参考文献 …… (261)

第 1 章　生物无机化学概要

1.1　什么是生物无机化学
1.2　金属蛋白中的金属功能
1.3　金属酶的功能
1.4　生物体中金属的信息传递作用
1.5　金属离子和核酸的相互作用
1.6　金属离子的输运和储存
1.7　医药中的金属
1.8　本书的内容安排

1.1　什么是生物无机化学

生物无机化学是经典无机化学和生物学的交叉学科。虽然生物学通常和有机化学联系在一起，但无机元素在生命过程中也很重要。表 1.1 列出了一些必需的无机元素和某些已知的生物效应。生物无机化学家研究的正是这些无机物种，特别着重研究它们在生物体内的功能。

表 1.1　重要金属离子的生物功能

金　属	功　能
钠	电荷载体，渗透压平衡
钾	电荷载体，渗透压平衡
镁	结构，水解酶，异构酶
钙	结构，触发剂，电荷携带
钒	固氮，氧化酶
铬	未知，可能和葡萄糖耐受性有关
钼	固氮，氧化酶，氧传递
钨	脱氢酶
锰	光合作用，氧化酶，结构
铁	氧化酶，双氧输运和储存，电子转移，固氮
钴	氧化酶，烃基转移
镍	加氢酶，水解酶
铜	氧化酶，双氧输运，电子转移
锌	结构，水解酶

无机元素已被作为结构和功能的探针，人为地引入到生物体系中。汞和铂等重金属被 X 射线晶体学家和电子显微镜专家用来帮助剖析大分子结构。顺磁金属离子在磁共振应用中也很有价值。金属化合物已不仅用于生物探针，而且也用作诊断和治疗的药物。铂抗癌药、金抗关节炎药以及铋辐射药剂的作用机理，是当前生物无机化学研究的热门课题。图 1.1 中给出了生物无机化学家最感兴趣的元素。

生物无机化学包括两个主要部分：一是研究生物中天然存在的无机元素，二是把金属引入

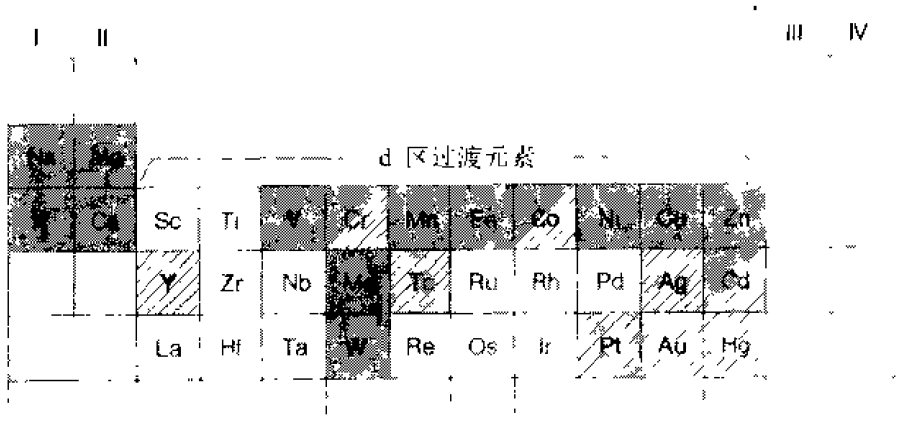


图 1.1　生物无机化学中的重要元素

灰色表示天然存在的元素，加斜线者表示作为探针或药物的元素

生物体系中作为探针和药物。围绕这一学科还有一些重要的研究内容：营养物中的无机元素；无机物种的毒性，包括自然体系和人为干预的解毒途径；生物体中金属离子的运输和储存。然而所有上述研究课题，仍没能包罗生物无机化学的全部研究领域。如同其他任何一门学科，生物无机化学的研究领域由那些最有创造性的研究者的工作来确定。因此，这一领域的研究工作也因时而异，因生物无机化学家的群体变化而异。

生物无机化学并非缺乏统一原则地罗列事实。本书的一个重要目的是使我们在该领域的知识系统化，并从当前人们感兴趣的诸多研究方向上，提取和归纳出重要原理。为了给后面讨论的原理和描述性内容奠定基础，本章的其余部分将以金属中心所表现出的功能为主线组织内容，概括目前这一研究领域的大部分专题。

1.2　金属蛋白中的金属功能

经常能在天然蛋白质的组成中找到金属。自然界学会了利用金属离子的特殊性质，来实现与生命过程相关的多种特殊功能。对这一问题，人们不禁会好奇地问，金属蛋白里的金属中心是否具有功能性？由于蛋白质周围环境的复杂性，生物无机化学家也许不可能复制出金属的这些功能，我们后面将讨论这一问题。具有催化功能的金属蛋白称为金属酶，在 1.3 节中将专门介绍这一类特殊物质。

1.2.a　双氧输运

金属酶专一执行的一个功能是呼吸作用。这里有三类已知的双氧输运蛋白：血红蛋白-肌红蛋白族，血蓝蛋白和蚯蚓血红蛋白。这些蛋白中的功能性金属核心示于图 1.2。在这些蛋白中，存在着一个精确的化学平衡，在 O_2 分子结合的铁或铜中心处，无一不进行着可逆的电子转移反应，或者说氧化还原反应。上述的反应导致 O—O 键的断裂并伴随氧化反应的化学过程。在血红蛋白(hemoglobin Hb)和肌红蛋白(myoglobin Mb)中，双氧结合部位是铁-卟啉配合物，O_2 结合以后，结构会发生变化。对于血红蛋白，结构的变化触发了蛋白质链的微妙运动，从而导致了摄取双氧的协同作用。卟啉环和一些有机辅因子的结构示于图 1.3。

其他两个呼吸蛋白在双氧结合反应中调用了一对金属离子(图 1.2)。在软体动物和节肢动物的血蓝蛋白(hemocyanin Hc)中，双氧结合在两个铜原子之间，而在海洋无脊椎动物的蚯

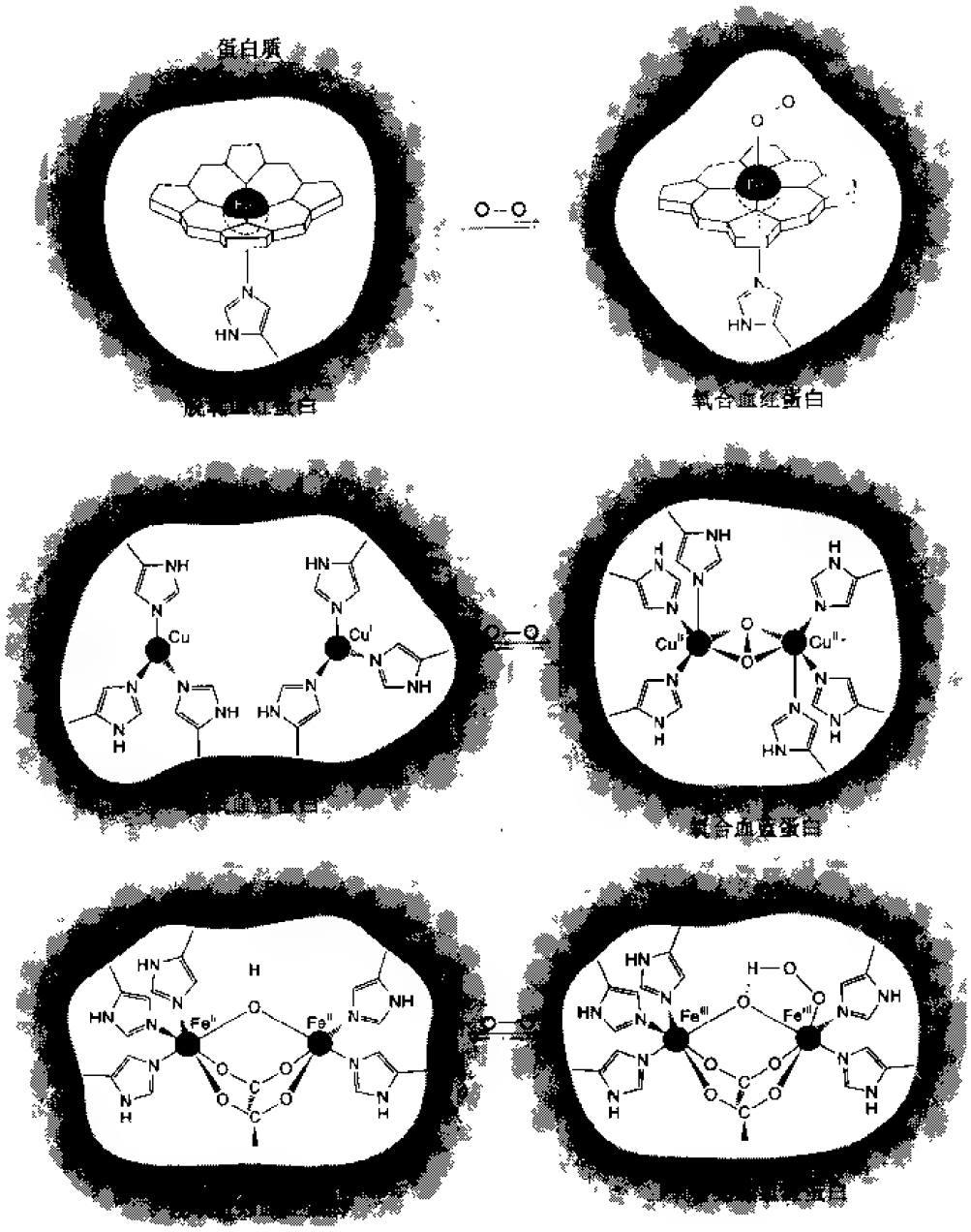


图 1.2　三类双氧结合蛋白中存在的功能单元

其中原卟啉 IX 被描述为血红素

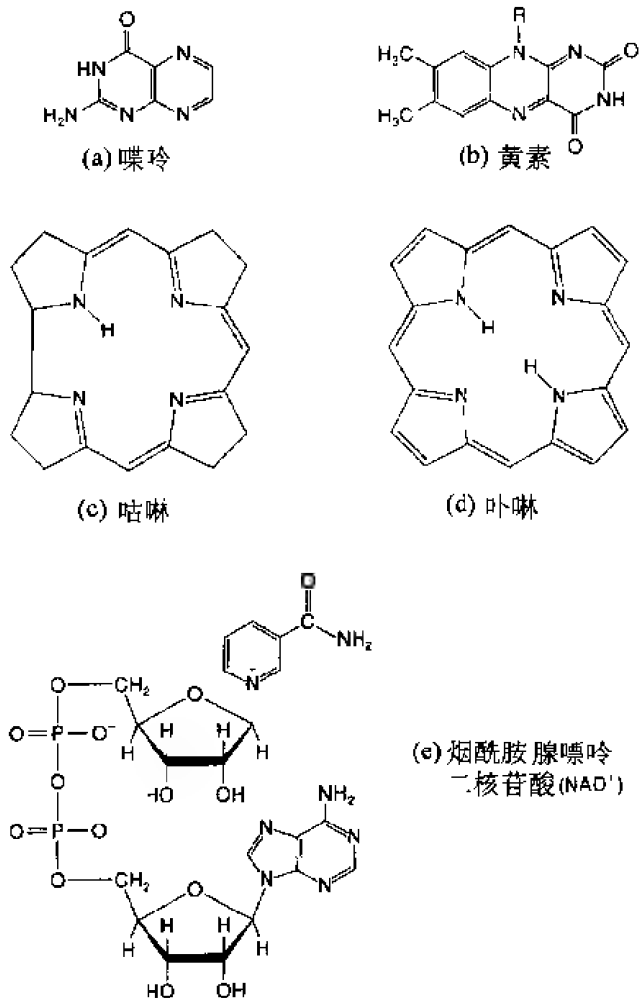


图 1.3　重要有机配体和辅因子

蚓血红蛋白(hemerythrin Hr)中，O_2 分子配位于 Fe_2 单元的端梢位置。在这两种结合方式中，O_2 结合反应都包括对双金属中心还原(或脱氧)形的氧化加成，产生氧化形的过氧化物或氢过氧化物衍生物。在生物无机化学中，Hc 和 Hr 是两个典型例子，其中一对金属离子表现出的功能(可逆结合氧)，与不同类型的蛋白 Hb 或 Mb 中金属卟啉单元所表现出的作用是相同的。而且，在这二类反应中应用的化学策略也非常相似。自然界就是这样用不同的过渡金属，在不同的有机体中，执行着相同的功能。类似的这些认识，构成了生物无机化学原理的基础，这是本书的核心。

1.2.b　电子转移

血红蛋白中的双氧结合金属中心，表明了生物无机化学如何应用酸碱反应这一化学反应的主要类型。O_2 作为 Lewis 碱，能够可逆地结合 Lewis 酸，即与卟啉环键合的铁。另一类包括净电子转移的主要化学反应存在于蛋白质中，蛋白质发生氧化还原转型，但并未催化底物分子整体发生化学变化。这样的生物无机载流子通常把电子传递给酶，或从酶得到电子，这类酶要具有氧化还原化学反应性，才能执行诸如固氮作用这样的特殊功能。有时，氧化还原活性中心直接结合在金属酶中。在生物无机化学中，两电子转移中心经常能在铁硫簇合物和细胞色素中

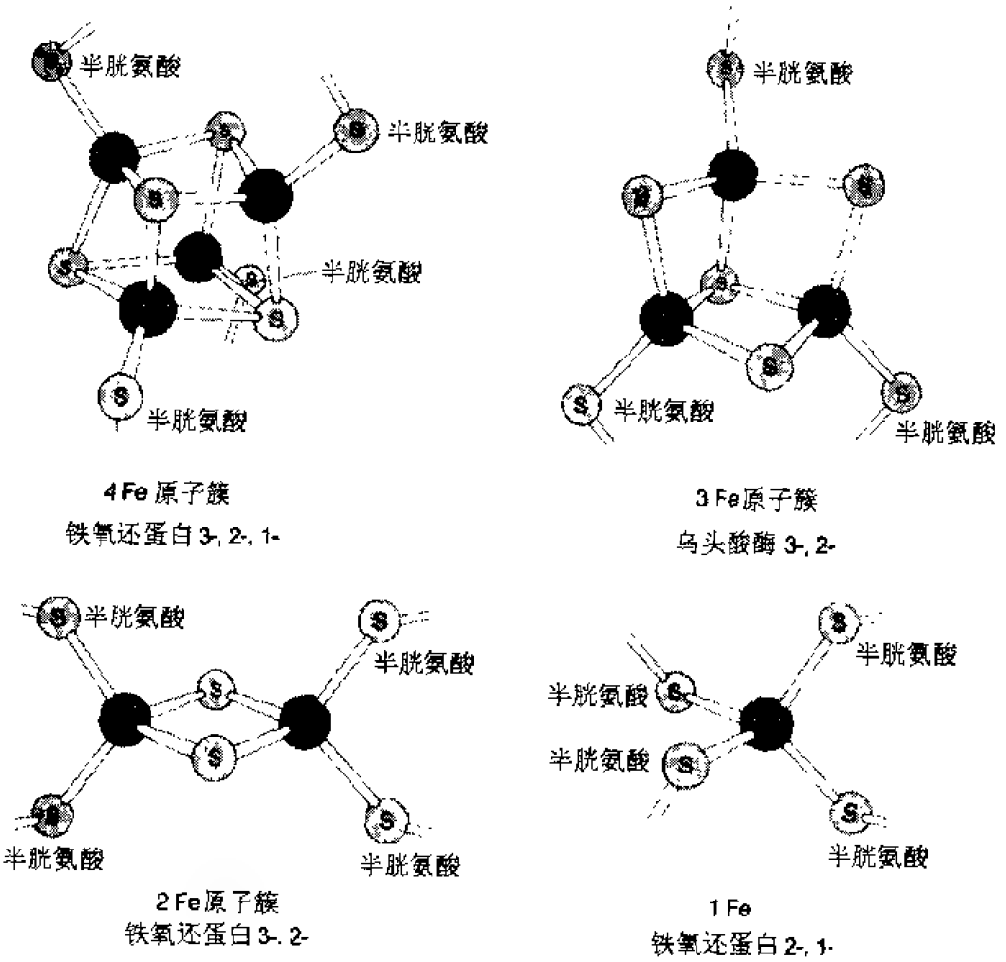


图 1.4　生物体内存在的铁-硫原子簇结构

图中给出典型的蛋白质，它们包围着这些原子簇以及全部簇电荷

碰到。后者中的铁卟啉基团用于双氧输运，类似于图 1.2 所示。一些 Fe_nS_n 单元的结构和它们最常见的生物无机氧化还原态示于图 1.4。表 1.2 列出了生物学中常见金属离子的氧化还原电位及 O_2 的对应值，O_2 是常和金属酶作用的底物。所引用的金属电位是指在水溶液中标准态时的数值，当金属离子和生物配体配位并嵌入到蛋白质基质中时，其数值会明显不同。

表 1.2　生物体内重要氧化还原活性金属离子及其氧物种的特定还原电位*

金属离子或底物的酸性溶液			
物　种	E^0/V	物　种	E^0/V
$Cu^{2+}+e^- = Cu^+$	+0.153	$O_2(g)+e^- = O_2^-$	−0.33
$Fe^{3+}+e^- = Fe^{2+}$	+0.771	$O_2(g)+H^++e^- = HO_2$	−0.13
$Mn^{3+}+e^- = Mn^{2+}$	+1.51	$O_2(g)+2H^++2e^- = H_2O_2(aq)$	+0.281
$Co^{3+}+e^- = Co^{2+}$	+1.842	$O_2(g)+4H^++4e^- = 2H_2O$	+0.815
		$O_2^-+e^-+2H^+ = H_2O_2$	+0.89
		$OH+H^++e^- = H_2O$	+2.31

* V. vs. NHE @ pH 7, 25°C。

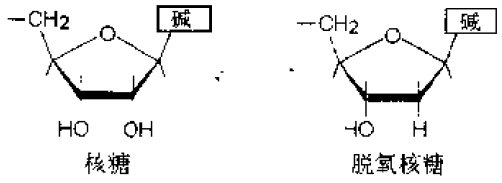
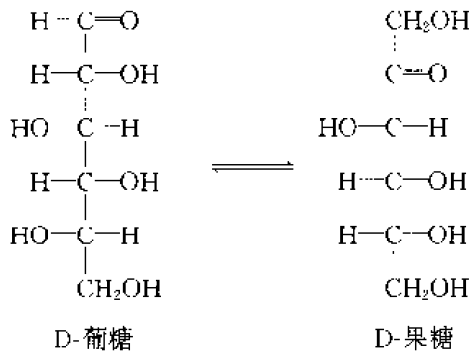
1.2.c 金属离子的结构作用

近来发现调节基因表达的一些蛋白质家族中含有 Zn^{2+} 离子。第一例被发现的这类金属蛋白是转录因子ⅢA(TFⅢA),它存在于非洲的爪蟾卵母细胞(*Xenopus*)中,是一种精确转录 5S 核糖体 RNA 基因所必需的蛋白。在这些蛋白质中,金属离子起结构作用,形成小核酸结合域的中心核,被称为"锌指"。在以 TFⅢA 为代表的一类蛋白质中,金属结合域表现出和 DNA 的直接相互作用。与基因调节有关的其他类含锌蛋白质已经发现,其中的金属稳定域可能还有其他作用。例如,Zn^{2+} 离子存在于大部分 DNA 和 RNA 的聚合酶中,金属离子在这些重要酶中的作用有待详细阐述。最后,几种与基因表达的金属调节作用有关的蛋白质现已得到表征。在这样的金属调节体系中,蛋白质的活性取决于是否存在结合金属离子。细菌 MerR 蛋白就是一例,它能在从 DNA 转录到 RNA 的层次上调节汞解毒系统的表达,也能调节哺乳动物中铁的应答系统。铁的应答系统在 RNA 翻译为蛋白质的层次上控制着铁蛋白、铁储存蛋白和铁输运蛋白的表达。

1.3 金属酶的功能

金属酶是金属蛋白中执行特殊催化功能的一个亚族。金属酶对底物分子起特定化学转化作用。表 1.3 归纳了某些金属酶的催化反应,并按其功能分类。同时列出了一些显著的转化作

表 1.3 重要金属酶及功能

功能	例子	
	酶	反应
水解酶类	羧肽酶	从蛋白质移走端氨基酸
	碳酸酐酶	$H_2O + CO_2 \longrightarrow H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$
	碱性磷酸盐酶	磷酸酯水解
保护性金属酶	超氧化物歧化酶	$2O_2^- + 2H^+ \rightleftharpoons H_2O_2 + O_2$
	过氧化氢酶	$2H_2O_2 \rightleftharpoons 2H_2O + O_2$
脱氢酶	肝乙醇脱氢酶	$CH_3CH_2OH + NAD^+ \rightleftharpoons CH_3CHO + NADH + H^+$
金属核苷酸化学	核苷酸还原酶	
异构化	葡糖异构化酶	
固氮	固氮酶	$N_2 + 8e^- + 8H^+ \longrightarrow 2NH_3 + H_2$
光合作用	光系统Ⅱ	$2H_2O \longrightarrow O_2 - 4H^+ + 4e^-$

用，这些转化作用和小分子化学中的转化无简单的类比性。表中包括了由 N_2 到 NH_3 的催化还原(固氮作用)、水氧化为 O_2 以及偕二醇(gem-diols)还原为单醇(核苷酸的还原)等反应。如表所示，金属酶可按功能分类。在每一类酶中，通常都有几类金属中心能够催化所要求的化学转化作用，类似的情况已经在呼吸蛋白中碰到。这种多样性的原因掩盖在生物进化史中，但很有可能是金属酶初始发展时，在岩石圈和生物圈的交界处，存在着某特定元素的生物利用率(bioavailability)，因而被迫开辟多种生物化学途径，来确保严格的细胞功能的生命力。

1.3.a 水解酶类

这类蛋白质能够催化加成，或者消除底物分子中水的成分。著名的例子是碳酸酐酶，它可促进 CO_2 的水解；肽酶和酯酶可催化羰基化合物的水解；磷酸酯酶能催化磷酸酯的分解。许多水解酶的活性部位都含有 Zn^{2+} 离子。这样的选择有利于金属降低含氧配体 pK_a 值的能力。例如对上述底物，因为二价锌离子不易形成其他氧化态，因此有可能避免不需要的电子转移反应。在水解酶类中碰到的其他金属离子 Mn^{2+}、Ni^{2+}、Ca^{2+}和 Mg^{2+}，也能进一步增强避免氧化还原活性物质产生的倾向性。

1.3.b 双电子氧化还原酶

许多金属酶催化的反应包含底物的氧化或还原。与 1.2.b 节讨论的电子转移化学不同，本节讨论的反应一般是两电子氧化还原过程，而且常涉及原子或基团的转移。在这类最重要和最普遍的反应中，氧原子被加到底物上。例如，细胞色素 P-450(P 来自"pigment")酶的铁卟啉中心可催化烃氧化到醇的反应；含有双核铜活性部位的酪氨酸酶可催化酚基底物的邻羟基化作用；亚硫酸盐氧化酶中存在与蝶呤环活性部位结合的钼原子，可催化亚硫酸盐氧化为硫酸盐。这些酶存在两方面的差异，即加在底物上的氧的来源和所含金属离子的特性。对细胞色素 P-450 而言，氧来源于双氧中的一个原子。对 1 mol 被氧化的底物，P-450 要求 1 mol 的还原剂 NAD(P)H。对于酪氨酸酶，氧仍来源于双氧，但不要求额外的辅因子。对于亚硫酸盐氧化酶，氧原子来源于水，每生成一个硫酸盐离子，就有两分子的细胞色素 *c* 被还原。

其他金属酶能从底物中消除氧原子。核苷酸还原酶(nucleotide reductase，RR)是一种承担当生物合成 DNA 第一步的酶。构成 DNA 基石的脱氧核苷酸在细胞中含量很低。为了促其复制，核苷酸首先被 RR 还原成脱氧核苷酸。RR 的一个亚单元包含一稳定的酪氨酸自由基(图1.5)和一个双核铁中心。后者的作用尚不很清楚，但有可能产生初始自由基，如果自由基被偶然还原掉，还可使其重新生成。在此可看出，蛋白质活性部位的无机和有机功能中心之间密切相关。另一个例子是硝酸盐还原酶，它能催化 NO_3^- 还原为 NO_2^- 的反应，这是绿色植物同化硝酸盐的关键步骤。硝酸盐还原酶中还含有一个钼中心，这与存于在亚硫酸盐氧化酶活性部位的钼类似。

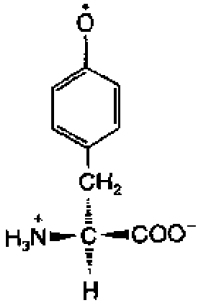


图 1.5 RR 亚单元包含的酪氨酸自由基
(注：原文无图题，该图题为译者补加)

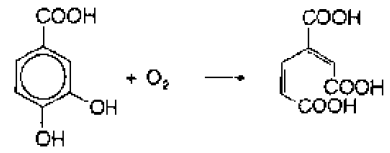
脱氢作用是另一类双电子氧化还原过程。从底物中消除 2 个电子和 2 个质子，与失去一分子的双氢是等价的。肝乙醇脱氢酶的活性部位含有 Zn(Ⅱ)离子，它能催化乙醇生成乙醛的反应。从释放出的两个氢原子中的一个加到有机辅因子 NAD((图1.3)上，生成 NADH。实际上，有些酶本身可产生双氢或消耗双氢。这些加氢酶是

包含铁-硫簇的复杂体系，其中经常含镍。

1.3.c 多电子对氧化还原酶

在 1.3.b 讨论的反应中，底物的氧化态由两个电子（或一个电子对）所改变。此外，金属酶也能参加到多电子对的转移反应中，其中的部分例子列于表 1.4。这些反应在很多基本生物化学路径中，具有相当大的重要性。而且这些路径一般不能被非酶的化学反应复制。氧代谢的两个关键过程涉及两分子水和一个氧分子之间的四电子转移。细胞色素 *c* 氧化酶是高度复杂的酶，它含有 2 个铜原子和 2 个血红素铁中心，能催化双氧到水的还原。细胞色素 *c* 氧化酶嵌入在细胞膜内，释放的能量能以跨膜质子电化学梯度（proton electrochemical gradient across cell membrane）的形式储存，并能转化为化学能，以促进 ADP 到 ATP 的磷酸化作用。氧化水到分子氧的可逆反应也能被金属酶催化。此类金属酶即为光系统 Ⅱ 中的光合释氧配合物（oxygen-evolving complex，OEC）。某些已知结构原子簇或目前未知结构的原子簇中，OEC 的活性部位包含 4 个锰原子。OEC 吸收光能来推动 2 个水分子偶合形成 O_2 的热力学耗能过程。

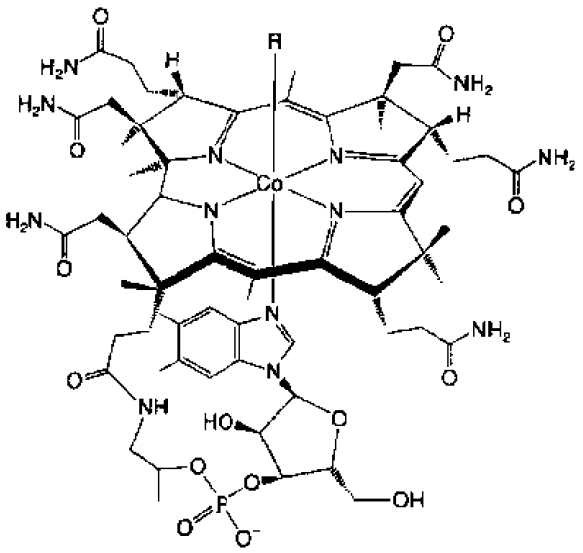
表 1.4 若干多电子对氧化还原反应

两电子对反应	
$O_2+4H^++4e^-$	$\longrightarrow 2H_2O$
$2H_2O$	$\longrightarrow O_2+4H^++4e^-$
	
三电子对反应	
N_2+6H^++6e	$\longrightarrow 2NH_3$
$SO_3^{2-}+8H^++6e^-$	$\longrightarrow H_2S+3H_2O$
$NO_2^-+8H^++6e$	$\longrightarrow NH_4^++2H_2O$

其他包含双氧的多电子对过程也和金属酶有关。例如含铁儿茶酚双加氧酶，能打断儿茶酚（即 1,2-二羟基苯）的芳香环。多电子对过程在氮的新陈代谢中也起重要作用。有些绿色植物能从它们的根瘤菌中得到氮的有用形式，根瘤菌有惊人的能力把空气中的氮分子还原成氨。有显著的六电子转移作用、被称为固氮酶的酶体系包含两种蛋白质，一种是所谓的铁钼蛋白，其中含一独特的铁钼辅因子 FeMoco，它由钼、铁和硫原子簇及三羧酸均柠檬酸盐组成。铁钼蛋白是氮分子结合与还原的部位。它也包含其他一些涉及电子转移的铁硫簇。钼在 FeMoco 中的位置，与其他在 1.3.b 节讨论过的含钼酶不同。在固氮酶体系中的第二种蛋白能以 ATP 相关的方式把电子转移到的铁钼蛋白，它还含有单一的 Fe_4S_4 原子簇。另一种和氮循环有关的酶是亚硝酸盐还原酶，它催化亚硝酸盐 NO_2^- 六电子还原到氨。此酶在其活性部位包含一个称为 siroheme 的还原铁-卟啉配合物。另一个类似的酶能催化亚硫酸盐六电子还原到硫化氢。

1.3.d 重排

许多生物转换作用不涉及底物氧化态的任何净改变。催化 1,2 碳变位的酶经常要求维生素 B_{12} 或其衍生物（图 1.6）作辅因子。这一辅因子是取代咕啉环的烷基钴（Ⅲ）配合物（图1.3），这是在生物学中研究得最清楚的有机金属单元。这里的有机金属化合物，是指任何一种有直接相连的金属-碳化学键的物质。许多用 B_{12} 作辅酶的化学反应是通过金属－自由基的途径引发的，或被 Co-C 键均裂催化。B_{12} 作辅酶的化学反应与前面提及的过渡金属产生的有机自由基间的联系由以下事实说明：B_{12} 以及和酪氨酰自由基相关的核苷酸还原酶（见1.3.b），二者催化从同一个核苷酸到脱氧核苷酸之间的转化。



R=CN(维生素 B_{12})
R=腺苷基(辅酶 B_{12})
R=甲基

图 1.6　钴胺素结构

另一个重要的重排，是柠檬酸盐在乌头酸酶催化的 Krebs 循环(即三羧酸循环)中，转化为异柠檬酸盐。乌头酸酶可加入铁和还原剂而活化，而且最近的工作表明，这样的活化要求在蛋白质活性部位的一个 Fe_4S_4 原子簇转化为一个 Fe_4S_4 原子簇。有趣的是，虽然这样的簇合物具有与电子转移过程关联的蛋白质特征，但在柠檬酸盐和异柠檬酸盐的相互转化机制中，却没有发现任何氧还反应过程的证据。

1.4　生物体中金属的信息传递作用

金属离子在生物体内可作为磁性罗盘，作为特殊细胞功能的触发剂，也能调节基因表达。研究这些细胞的信息传递作用是生物无机化学中一个活跃的前沿领域。嗜磁细菌(magnetotactic bacteria)能用磁铁矿(Fe_3O_4)作为体内的导航罗盘。这些微生物向北游动的同时，同时沿着地球磁力线的方向，朝下向水深处游，以避免含高浓度氧的表层水对它们的毒性。它们只有在地球的这一磁极才有方向性，当转移到相反的半球上时，它们的方向性发生了混乱，变为朝上向水表层游！人们相信，有些蜜蜂、信鸽，甚至人类，也能利用他们大脑中的磁性物质达到控制方向的目的。碱金属和碱土金属离子，特别是 Na^+、K^+ 和 Ca^{2+}，能在生物体内触发细胞响应。神经元可被快速跨膜的钠离子流启动，钙结合蛋白(比如钙调蛋白)能调控细胞内的功能，这是信息传递现象的两个典型例子。实际上，Ca^{2+} 离子被认为是“第二信使”。例如，激素结合到细胞表面的基本信号，可转变为细胞内 Ca^{2+} 离子浓度的变化信息。锌指是生物学中最新发现的金属离子族，它存在于许多蛋白中，可调节转录作用(见 1.2.c 节)。我们目前尚不知道，锌是否在蛋白中不仅起结构作用，或者说锌的浓度是否能以某种方式调节基因表达。

1.5　金属离子和核酸的相互作用

金属离子也能直接与 DNA 和 RNA 相互作用。有些相互作用并非是特定的，例如，Na^+ 和 Mg^{2+} 离子通过静电相互作用来稳定核酸的结构，这种静电作用使带电荷的磷酸基团之间能够互相屏蔽。最近已发现了金属离子对核酸特定的键合作用。因此，Mg^{2+} 和其他的二价金属离子可作为辅因子，活化有催化作用的 RNA 分子；而 K^+ 这样的一价阳离子则可稳定端粒(telo-

meres)的结构，端粒是能在染色体末端中断 DNA 的双螺旋离子的单元。端粒的结构(图 1.7)特征是非 Watson-Crick 碱基对的相互作用，以及 8 个鸟嘌呤碱基簇围绕着中心的一价金属离子。这种结构的相对稳定性由细胞中 Na^+、K^+ 离子的浓度控制。另外，有些以无机元素为基础的药物，例如顺铂，可直接和 DNA 配位(见 1.7 节)，金属配合物已经用作剪切剂(cleaving agents)来探测核酸的三级结构。

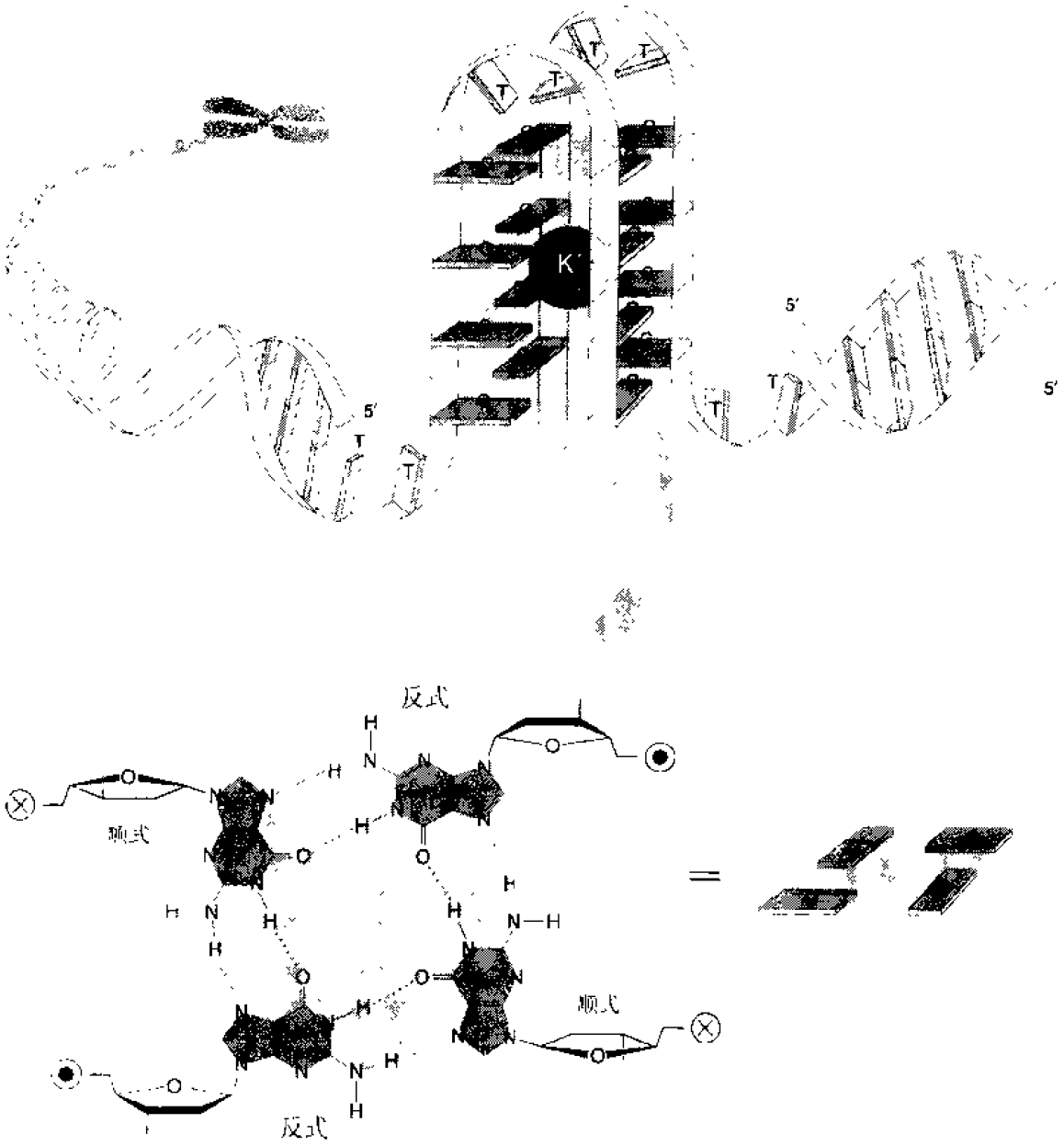


图 1.7　染色体末端端粒单元的可能结构
其中可找到由钾离子稳定的鸟嘌呤四聚体

1.6 金属离子的输运和储存

金属离子是如何进入细胞和如何被储存的？这一专题是生物无机化学研究中的一个活跃领域，尽管它不能像其他专题那样，按照金属的功能来分类。这方面研究得最清楚的金属是铁。铁进入细菌细胞后，被细菌分泌的称为载铁体(siderophores)的低分子量化合物螯合。在哺乳动物中，铁被血清蛋白中的运铁蛋白(transferrin)结合和输运，大部分再被铁蛋白(ferritin)以活体形式储存。铁蛋白有近似球形的空心层，能结合 4500 个 Fe^{3+} 离子。铁离子在这些蛋白体系中如何移动？其细节尚不清楚，这正是目前研究的热点。铜由血清蛋白中的血浆铜蓝蛋白(ceruloplasmin)输运，另一个类似的蛋白称为白蛋白(albumin)，也能结合和输运金属离子。金属硫蛋白(metallothionein)是富含半胱氨酸的蛋白，当细胞中的某些金属离子，例如具有毒性的 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 离子过量时，就会在细胞中出现大量的金属硫蛋白。因此，金属硫蛋白起着防护作用，也可参与控制金属的传输、储存和维持正常状态下的浓度。

1.7 医药中的金属

许多人首先从文献中知道金属在医药中的用途及金属的毒性。铁和铜的应用可通过文字记载追溯到古希腊和希伯莱。Lewis Carroll 的“疯帽人”遭受汞中毒的痛苦。在使用了几个世纪的常见金属离子中，Hg^{2+} 用来治疗梅毒，Mg^{2+} 用来治疗肠功能紊乱，Fe^{2+} 则用来治疗贫血。这些金属的早期应用是简单和初步的，并未经过精细加工。直到近来，有机化学家推出了磺胺药、青霉素及氯甲喹呤这类基于机理(mechanism-based)的抑制剂，他们的贡献促使金属药物得到更巧妙和有效的应用。然而，当今的无机化学也开始对现代医学产生了很大的影响。三种重要的无机药物示于图 1.8 中。

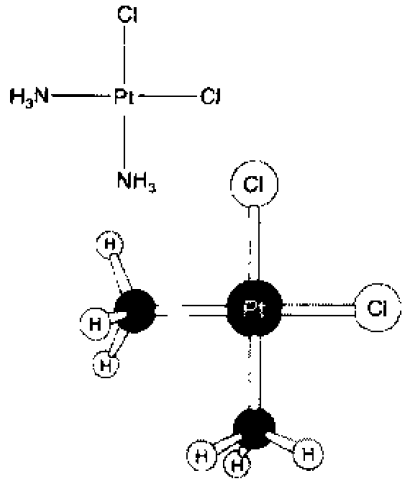
一个最重要的抗癌药是顺铂(cisplatin)*cis*-$Pt(NH_3)_2Cl_2$，通过静脉注射可用来治疗睾丸、卵巢及头颈部的肿瘤。顺铂对早期诊断出的睾丸癌，治愈率超过 90%。另一个是 Auranofin [$Au(PEt_3)(ttag)$]，此处 ttag 表示 4-O-乙酰硫葡萄糖(tetra-O-acetylthioglucose)，这是第一个治疗类风湿关节炎的口服药。它是抗关节炎黄金试剂中的一重要药剂，其他的黄金试剂都是注射液。第三个实例是 $Tc(CNR)_6^+$，这里锝是放射性同位素 ^{99m}Tc。这类配合物可被心肌纤维选择性地吸收，已证明它对心脏造影非常有用。铂、金和锝这三个属于非必需的过渡元素已在医学中找到了自己的位置。由于无机化合物的广泛性和多样性，无机化学用于改善人类健康的可能性是无止境的。在这方面，生物无机化学尚处于婴儿期，但它必将会成为一个重要和快速发展的领域。

1.8 本书的内容安排

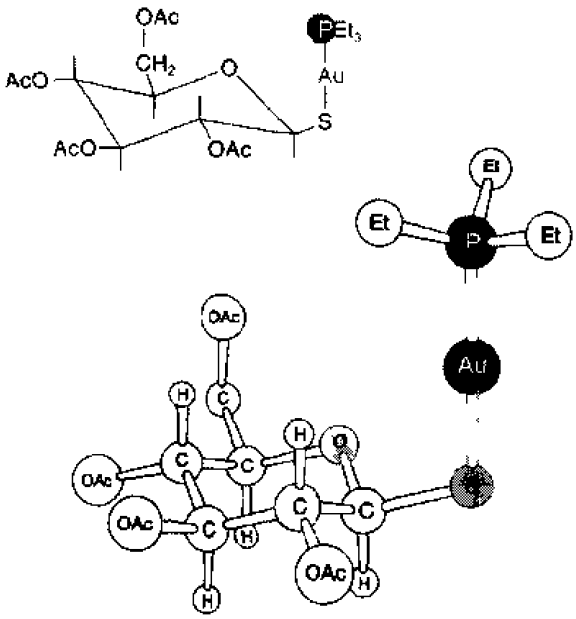
本章的讨论涉及目前生物无机化学研究的基本问题，为后续章节提供了概要和背景知识。讨论专题是根据金属离子在生物体内的功能划分，这一研究领域中通常都按照这种方式来组织框架。但在本书中，我们采用了不同的处理方式。前三章是引论，给对无机化学、生物化学以及生物无机化学家常用的物理方法陌生的读者，提供起码的基础知识。第 2 章给出了与生物体中金属离子功能有关的配位化学要点。第 3 章包含了蛋白质、核酸和其他生物大分子的类似信息。第 4 章对物理方法作了简要讨论。这三章均未对所给专题作严格精确的论述，其内容可从很多相关的教科书中得到，经验丰富的读者可略过这三章。

第5到第12章共八章是本书的核心，试图从最广泛的生物无机体系的研究文献中，提炼出基本原理。这些章节的结构框架是沿着这样的方向组织的：即从活体细胞中金属离子的利用性到生物无机化学在分子机理上的直接细节。在这八章中，我们力图把从描述生物化学中提炼出的原理，又贯穿到具体的描述性内容中去。

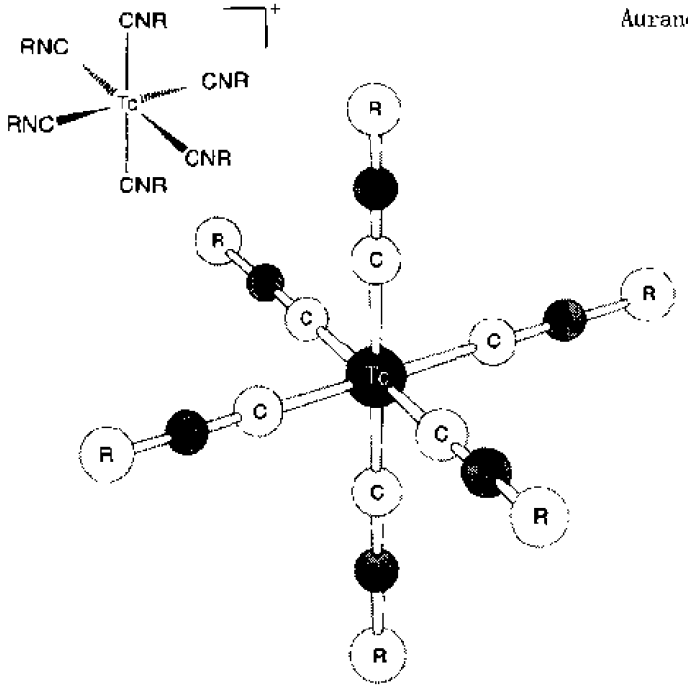
最后一章为生物无机化学研究领域出现的新挑战，讨论的内容到1994年为止。



顺铂，抗癌药



Auranofin，类风湿关节炎口服药



Cardiolyte，心脏造影剂

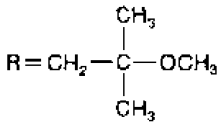


图 1.8　用于现代医学的三种无机化合物的结构

习　题

1. 生物化学史上一个重要的实验是：Sumner 证明了一种称为刀豆脲酶的酶能结晶出来。该结晶酶是一个纯蛋白，这一事实对于"所有酶都是蛋白质"的争论很重要。大约 50 年后，发现了在脲酶的每个蛋白质分子中，包含 2 个 Ni^{2+} 离子。评述：如果这一发现提早 50 年，将如何影响生物化学的发展。
2. 你的宠物龙虾(pet lobster，一种节肢动物)萎靡不振，已发现它患贫血症。你认为在其食物中添加铁是否为好疗法？请另给出一种治疗方法。
3. 一种新的电子转移蛋白已经分离出来了，元素分析指出它只含锌。评述这一分析结果。
4. 当你试图在当地的化学试剂商店买一种心脏造影剂 cardiolyte 时，店员告诉你，他们没有这种试剂，因为它没有明确的有效期。请解释为什么。这一性质如何使 cardiolyte 成为优良的放射性药物？

参 考 文 献

一般参考文献

A. W. Addison, W. R. Cullen, D. Dolphin, and B. R. James, eds. 1977. *Biological Aspects of Inorganic Chemistry*. Wiley-Interscience, New York.

I. Bertini, H. B. Gray, S. J. Lippard, and J. S. Valentine. 1994. *Bioinorganic Chemistry*. University Science Books, Mill Valley, CA.

J. J. R. Frausto da Silva and R. J. Williams. 1991. *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*. Oxford University Press, Oxford.

R. W. Hay. 1984. *Bio-Inorganic Chemistry*. Ellis Horwood, Chichester, United Kingdom.

M. N. Hughes. 1981. *The Inorganic Chemistry of Biological Processes*, 2nd ed. John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.

W. Kaim and B. Schwederski. 1991. *Bioanorganische Chemie*. Teubner, Stuttgart.

E. Ochiai. 1977. *Bioinorganic Chemistry, an Introduction*. Allyn and Bacon, Boston.

R. J. P. Williams. 1990. "Bio-Inorganic Chemistry: Its Conceptual Evolution." *Coord. Chem. Rev.* 100, 573–610.

生物无机化学丛书

G. L. Eichhorn, ed. 1973. *Inorganic Biochemistry*, Volumes 1 and 2. Elsevier Scientific, Amsterdam.

G. L. Eichhorn and L. G. Marzilli, eds. 1979–. Volumes in *Advances in Inorganic Biochemistry*. Elsevier Biomedical, New York.

R. W. Hay, J. R. Dilworth, and K. B. Nolan, eds. 1991–. *Perspectives on Bioinorganic Chemistry*. JAI Press, London.

S. J. Lippard, ed. 1973 and 1990. Volumes 18 and 38 in *Progress in Inorganic Chemistry*. Wiley-Interscience, New York.

H. Sigel, ed. 1973–. Volumes in *Metal Ions in Biological Systems*. Marcel Dekker, New York.

T. G. Spiro, ed. 1980–. Volumes in *Metals in Biology*. Wiley-Interscience, New York.

第 2 章　与生物无机研究有关的配位化学原理

2.1　热力学要点
2.2　动力学要点
2.3　生物体中金属离子的电子结构和几何结构
2.4　配合物中配体的反应性
2.5　模型配合物和自发自组装概念

本章给出了与生物体中金属离子作用有特殊关系的无机配位化学的某些内容。在生物环境中，金属离子特有的性质和那些围绕着它们的有机官能团不同。为了理解金属中心的功能，需要对这些特殊性质有起码的了解。本章提供了关于金属离子化学反应和电子结构特点的信息，有关物理性质的测量将在第 4 章另行讨论。

2.1　热力学要点

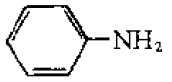
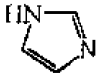
2.1.a　软硬酸碱概念

生物体中的金属离子对配位给体的结合倾向，经常受软硬酸碱理论的制约。表 2.1 列出了前述重要金属离子（已列于表 1.1）的软硬特性，其中的一些用作生物探针和药物。在这一分类表中，“软”意味着体积大且易被极化；而“硬”意味着体积小且不易被极化。金属离子可认为是 Lewis 酸。与中心金属离子配位的配体是 Lewis 碱，它们都按软硬酸碱规则列于表中。在生物介质中，提供这些配体的有蛋白质侧链、核酸的碱基、小细胞的细胞质成分以及有机辅因子（见图 1.3），当然还有水分子。虽然存在例外情况，但在酸碱结合时的一般规律是：硬酸亲硬碱，软酸亲软碱。例如，制备 X 射线结构分析物相所采用的重原子衍生物时，可把蛋白质晶体浸入到 K_2PtCl_4 的溶液中，软的 Pt(Ⅱ)离子明显倾向结合暴露在外的软配体，最常见的是结合半胱氨酸的巯基或甲硫氨酸的硫醚键部位，而与暴露在外的谷氨酸或天冬氨酸中羧酸根结合的可能性则小得多。碱金属和碱土金属例如 Ca^{2+} 则最经常和羧酸上的氧原子结合，Fe^{3+} 和羧酸根或酚基上的氧配位，Cu^{2+} 则和组氨酸上的氮配位（表 2.1）。软硬酸碱规则用在生物无机化学中的最好例证是金属硫蛋白（图 2.1）。在这类小分子蛋白质中，几乎 30%～35%的氨基酸是半胱氨酸残基，其巯基最容易结合的是软金属离子，如 Cd^{2+}、Hg^{2+}、Pb^{2+} 和 Tl^{+}。金属硫蛋白的一个生物功能是保护细胞，以防止这些金属离子的毒害作用。

表 2.1　生物无机化学中重要配体和金属离子的软硬酸碱分类

金　属			配　体		
硬					
H^-	Mn^{2+}	Cr^{3+}	H_2O	CO_3^{2-}	NH_3
Na^+	Al^{3+}	Co^{3+}	OH^-	NO_3^-	RNH_2
K^+	Ga^{3+}	Fe^{3+}	$CH_3CO_2^-$	ROH	N_2H_4
Mg^{2+}	Ca^{2+}	Tl^{3+}	PO_4^{3-}	R_2O	RO^-
			$ROPO_3^{2-}$	$(RO)_2PO_2^-$	Cl^-

续表

金属			配体	
交界				
Fe^{2+}	Ni^{2+}	Zn^{2+}	NO_2^-	
Co^{2+}	Cu^{2+}		N_2	
			SO_3^{2-}	
			Br^-	
			N_3^-	
软				
Cu^+	Pt^{2+}	Pt^{4+}	R_2S	R_3P
Au^+	Tl^+	Hg^{2+}	RS^-	CN^-
Cd^{2+}	Pb^{2+}		RSH	RNC
			$(RS)_2PO_2^-$	$(RO)_2P(O)S$
			SCN^-	CO
			H^-	R^-

2.1.b 螯合作用和 Irving-Williams 序列

螯合作用是指从一个配体上有两个或更多的配位原子和中心的金属原子结合。当螯合物生成时，伴随从配位层释放出非螯合配体(通常是水分子)，熵值增加，其结果使金属螯合物有异常的稳定性。这一现象可从 2.1 式中看出：

$$[Ni(OH_2)_6]^{2+} + H_2(edta)^{2-} \longrightarrow [Ni(edta)]^{2-} + 4H_2O + 2H_3O^+ \qquad (2.1)$$

Ni(Ⅱ)在水溶液中被六齿配体乙二胺四乙酸($H_2(edta)^{2-}$，其质子化的形式在图 2.2 中给出)螯合。本书以后将把 $H_2(edta)^{2-}$ 简化为 EDTA 形式来表示。类似这样的配体，可用于医药上螯合活体中存在的过量毒性金属，也能用作食物添加剂，螯合必需的金属元素，限制有害细菌对它们的利用，从而防止食物腐败。在要研究的生物体系的缓冲溶液中，也常加入 EDTA 配体，以减少某些游离金属离子的浓度，而这些金属离子的存在能够促使不必要的反应发生。

螯合作用在生物无机体系中一个重要的例子，是图 1.3 所给出的卟啉和咕啉配体的螯合作用。这些大环分子有接近共面的 4 个吡咯环，吡咯环上的配位氮原子直接指向中心的金属离子。因此，金属卟啉或金属咕啉在热力学上是很稳定的，能螯合具有不同氧化态的多种金属离子。结果，这些螯合单元提供了在生物中广泛存在、能被利用的生物无机功能基团，细胞色素(Fe)、叶绿素(Mg)和维生素 B_{12}(Co)就是其中的几例。

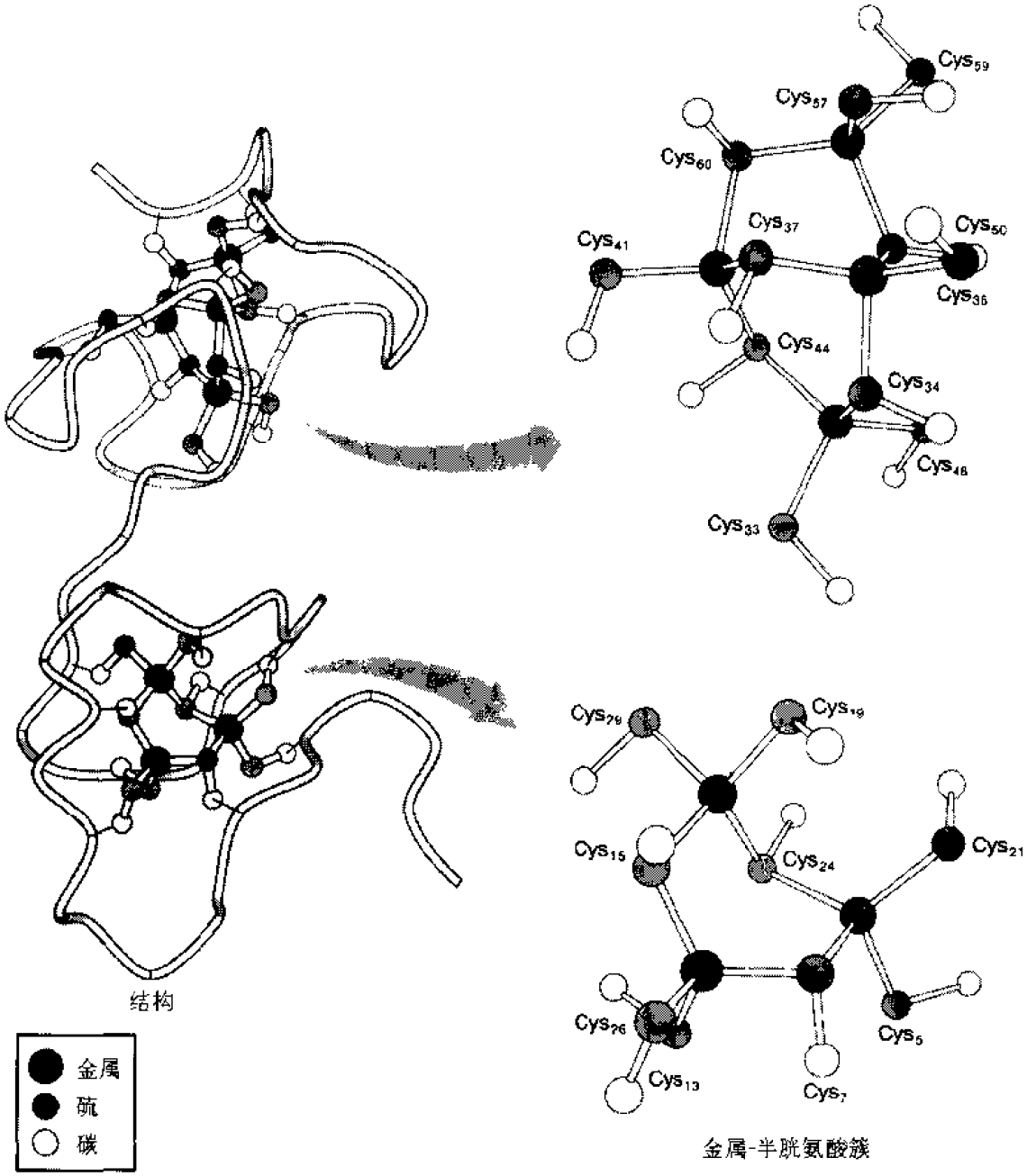
另一个常用的无机化学原理是：对一个给定的配体，第一过渡系的二价金属离子与它结合的典型倾向性遵循下面的稳定性顺序：

$$Ca^{2+} < Mg^{2+} < Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}。$$

该顺序首先由 Irving-Williams 给出，因此，称为 Irving-Williams 序列，它的顺序对应于金属离子半径的减小，金属和配体之间的化学键的增强。

2.1.c 配体的 pK_a 值

生物体中大部分金属离子的正电荷，对结合于配位层的质子配体的酸性阴离子(共轭碱)起稳定作用。这一效应的最好例证是配位水。包括硫醇、咪唑、酚、醇、磷酸、羧酸及其衍生物等



氨基酸序列

CH_3CONH–Met Asp Pro Asn **Cys** Ser **Cys** Ala Thr Asp Gly Ser **Cys** Ser **Cys** Ala Gly Ser **Cys** Lys **Cys** Lys Gln **Cys** Lys **Cys** Thr Ser Cys Lys-Lys Ser **Cys Cys** Ser **Cys Cys** Pro Val Gly **Cys** Ala Lys **Cys** Ser Gln Gly **Cys** Ile **Cys** Lys Glu Ala Ser Asp Lys **Cys** Ser **Cys Cys** Ala-COO^-

图 2.1　金属硫蛋白及其四金属(上)和三金属(下)簇的氨基酸序列和三维结构

许多生物配体中，都存在配位水。表 2.2 列出了重要配位基团的 pK_a 值，包括有、无不同金属离子的数值。若把所带电荷作为考虑问题的基点，则二价金属离子比相应的二价离子能更有效地降低质子配体的 pK_a 值。

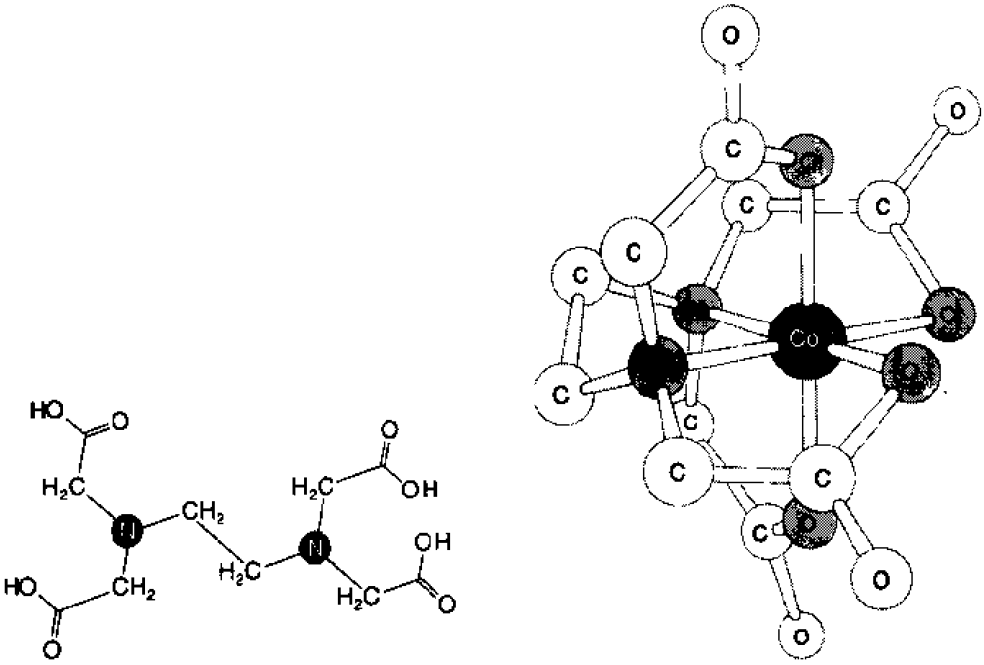


图 2.2 (a) 金属螯合剂乙二氨四乙酸(H_4EDTA)和(b) EDTA 的 Co^{3+}配合物的结构

配位水脱质子生成羟基配体，是几种金属酶催化水解机理中所假定的一个步骤。两个或几个金属离子与一个质子配体的配位，甚至会使 pK_a 值惊人地降低。这一效应在表 2.3 中用铁(Ⅲ)的水解来说明。在$[Fe(OH_2)_6]^{3+}$中，水去质子的pK_a值是2.2，而在有羟基配位的

表 2.2 有、无金属的重要配体的 pK_a 值

配体和反应	金属离子	$-\log K$ (25℃, 0.1 mol/L)
$H_2O + M^{2+} \rightleftharpoons M-OH^+ + H^+$	无	14.0
	Ca^{2+}	13.4
	Mn^{2+}	11.1
	Cu^{2+}	10.7
	Zn^{2+}	10.0
$NH_3 + M^{2+} \rightleftharpoons M-NH_2^+ + H^+$	无	35.0
	Co^{2+}	32.9
	Cu^{2+}	30.7
	Ni^{2+}	32.2
$CH_3COOH + M^{2+} \rightleftharpoons CH_3COOM^+ + H^+$	无	4.7
	Mg^{2+}	4.2
	Ca^{2+}	4.2
	Ni^{2+}	4.0
	Cu^{2+}	3.0
咪唑 $+ M^{2+} \rightleftharpoons$ M-咪唑$^{2+} + H^+$	无	7.0
	Co^{2+}	4.6
	Ni^{2+}	4.0
	Cu^{2+}	3.8

$[Fe(OH_2)_4(OH)_2]^+$中，由于生成(μ-羟基)-或 μ-(氧)双铁(Ⅲ)单元，去质子的 pK_a 值约等于6。这些结果说明了如果没有配体的支撑，水合铁(Ⅲ)离子以及许多其他的金属离子配合物都不能在7左右的生理 pH 下存在。其他质子生物配体的二聚或多聚金属离子则相当普遍地存在着，例如在铁硫蛋白中发现三桥联的(μ_3-硫)三铁簇单元，在牛红血球超氧化物歧化酶(脱氢的组氨酸咪唑基侧链)中发现的桥联(μ_2-咪唑基)铜(Ⅱ)-锌(Ⅱ)。

表 2.3 Fe(Ⅲ)在 25℃的水解反应[a]

反　应	pK_a
$Fe^{3+} + H_2O \longrightarrow Fe(OH)^{2+} + H^+$	2.2
$2Fe^{3+} + 2H_2O \longrightarrow Fe_2(OH)_2^{4+} + 2H^+$	2.9
$Fe(OH)^{2+} + H_2O \longrightarrow Fe(OH)_2^+ + H^+$	3.5
$Fe(OH)_2^+ + H_2O \longrightarrow Fe(OH)_3\downarrow + H^+$	6
$Fe(OH)_3 + H_2O \longrightarrow Fe(OH)_4^- + H^+$	10

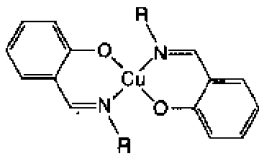
[a] 额外配位到铁原子上的水分子未表示出。

2.1.d 氧化还原电位的调节

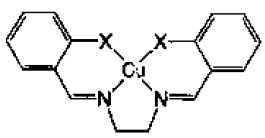
改变金属中心的配位原子和立体化学，能使电子转移反应的电位发生很大变化。这些因素的影响，可使表 1.2 中水合离子电位的改变大于 1.0 V。表 2.4 说明了不同配体调节 Cu(Ⅰ)/Cu(Ⅱ)氧化还原电位的能力，这是在无机化学和生物无机化学中均研究得最充分的一个例子。铜(Ⅰ)是闭壳层的 d^{10}结构的离子(见 2.4 节)，倾向于形成四配位的四面体构型或三配位的三角形构型。而另一方面，二价铜配合物则是典型的平面四方构型，或同时带有额外的一个或两个结合较弱的轴向配体。因此，Cu(Ⅰ)比 Cu(Ⅱ)通常更容易被具有四面体构型的配位环境稳定，致使 Cu(Ⅰ)的氧化还原电位升高，成为更强的氧化剂。如表 2.4 中所示，在 $Cu(R\text{-}sal)_2$中引入一个大的 R 基团，则配合物的几何构型由平面四方向四面体形畸变，从而使电位提高，铜(Ⅱ)更容易被还原。另外，Cu(Ⅰ)是软酸，倾向于结合 SR^- 或 R_2S 这样的软配体。因此，软配体取代配位层内的其他配体也提高了 Cu(Ⅰ)/Cu(Ⅱ)的还原电位。

表 2.4 DMF 溶液中配体对 Cu(Ⅰ)/Cu(Ⅱ)还原电位[a]的影响

化合物名称	$E_{1/2}$/V
$Cu(O\text{-}sal)_2en$	−1.21
$Cu(Me\text{-}sal)_2$	−0.90
$Cu(Et\text{-}sal)_2$	−0.86
$Cu(S\ sal)_2en$	−0.83
$Cu(i\text{-}Pr\text{-}sal)_2$	−0.74
$Cu(t\text{-}Bu\text{-}sal)_2$	−0.66



$Cu(R\text{-}sal)_2$



$Cu(X\text{-}sal)_2en$
X = O or S

[a] 配合物在此电位下一半被氧化，一半被还原。

配体的类型和立体化学对Cu(Ⅰ)/Cu(Ⅱ)电位的影响，不仅从表2.4列出的无机配合物中表现出来，而且在某些含铜的蛋白质中也表现出同样的影响。在这里，高氧还电位的获得，是蛋白质用两个组氨酸的咪唑基和一个半胱氨酸的硫基侧链作为配体，通过配位几何构型向平面三角形畸变来实现的。氧化还原电位被局部的蛋白质环境调节，还有很多其他重要例子，这在生物无机化学中经常碰到，其中的例子有铁硫簇和细胞色素。有时，尽管残基对金属不一定是配位关系，但电位还会受金属离子周围残基具有的局部介电常数影响。这一现象和简单配合物中溶剂对氧化还原电位的影响类似。

2.1.e 生物高分子的作用

如前所述，在生物环境中金属中心的热力学稳定性，不仅由金属内在的对某一氧化态的倾向性、配体组合和配位几何构型所决定，而且也由生物高分子通过它们的三维结构，控制立体化学及提供配体的能力所决定。非配位的残基对某些影响因素也有贡献：局部的亲水性或憎水性、配位部位的空间位阻、能与金属配位层中成键或非键原子相互作用以提高或者降低稳定性的氢键基团等。真正试图了解金属在生物体中的功能如何，必须对金属和核酸及蛋白质键合时的种种因素加以阐明。

螯合作用在生物无机化学中最惊人的表现，是在很多金属蛋白核心中，存在着强的特定金属结合部位。自然界中最有效的螯合剂可能是能折叠的(见第3章)蛋白质链，它能给金属中心提供所需立体化学环境各种取向的氨基酸残基配体。这一现象最好的例证是牛红血球超氧化物歧化酶(Cu_2Zn_2SOD)中的锌结合部位。锌在这一位置的配位环境对锌的存在非常有利，以至于脱金属(或者远离金属)蛋白(E_2E_2SOD，E＝金属空缺)能够用透析方法，从磷酸盐缓冲溶液中转移出痕量的锌。这一结合部位也是特定的，如果Cu^{2+}占据了Zn^{2+}的位置，生成的Cu_2Cu_2SOD用过量二价锌处理，则锌位置的铜能被锌取代。这一化学现象很反常，因为它违背了Irving-Williams序列(参见2.1.b)通常的亲疏规则。显然，锌在这一部位有重要的功能，这一特定部位能以某种方式，确保必需金属离子的特殊作用。

2.2 动力学要点

2.2.a 配体交换速率

表2.5列出了许多必需金属离子的水交换速率。从这些数据可清楚看出，M—OH_2键是很活泼和易断的，而且能以每秒钟10亿次的速率很快重新生成。金属-配体之间键的活性通常遵循表2.5中水配位离子的规律。一般来说，电荷低的M^{2+}比电荷高的M^{3+}与配体交换速率快。像Cr^{3+}和Co^{3+}这样惰性非常大的第一过渡系金属离子，在生物无机化学中极少碰到。第二、第三过渡系的金属配合物与第一过渡系的同族对应配合物相比，动力学惰性要大得多。例如，当抗癌药顺-$[Pt(NH_3)_2Cl_2]$通过失去氯配体和DNA结合后，即使长时间地透析这一含铂的生物高分子，铂也不能被交换出来。只有氰离子这类对铂有极强结合力的配体，才能置换出Pt DNA加合物。类似的情况存在于和钌键合的氨基酸残基，这在蛋白质电子转移反应的研究中会碰到。

当和多齿螯合配体结合时，第一过渡系金属离子(比如Fe^{2+})的配体快速交换速率明显减小。例如，金属卟啉(图1.3)在动力学上相当惰性。然而，非螯合环上的轴向配体则能进行通常的快速配体交换。例如，CO、RS^-和CN^-等配体能形成更加惰性的M L键。很多金属卟啉中

包含键合得很强的金属离子，即使长时间进行对抗强螯合配体的透析，其中的螯合金属离子也不能和游离金属离子交换。由于蛋白质的空间屏蔽作用，通常导致溶剂无法接近金属配位层，形成了这些蛋白质核心的动力学惰性。如果蛋白质由于加热，或添加某一溶剂（如二甲基亚砜）使其变性，则金属通常能释放出来。

表 2.5　25℃ 时，水分子从金属离子第一配位层交换的速率

离子	k_1/s^{-1}	离子	k_1/s^{-1}	离子	k_1/s^{-1}
Li^+	4×10^8	V^{2+}	8×10^1	Sn^{2+}	$>10^4$
Na^+	7×10^8	Cr^{2+}	1×10^9	Hg^{2+}	4×10^8
K^+	1×10^9	Mn^{2+}	2×10^7	Al^{3+}	1
Be^{2+}	8×10^2	Fe^{2+}	4×10^6	Fe^{3+}	2×10^2
Mg^{2+}	6×10^5	Co^{2+}	3×10^6	Ga^{3+}	4×10^2
Ca^{2+}	3×10^8	Ni^{2+}	4×10^4	Gd^{3+}	2×10^9
Ba^{2+}	2×10^9	Cu^{2+}	1×10^9	Bi^{3+}	$>10^4$
		Zn^{2+}	2×10^7	Cr^{3+}	2×10^{-6}
				Co^{3+}	$<10^{-6}$
				Rh^{3+}	6×10^{-9}

2.2.b　取代反应

金属离子配位层中的一个配体被另一个配体所取代，可以有缔合（二级）或解离（一级）两种途径，其动力学机理分别类似于有机化学取代反应中的 S_N2 和 S_N1 机制。配位数低（≤4）的金属离子倾向于进行缔合机制的配体取代反应，而高配位金属（配位数≥6）则采用解离的途径。发生在蛋白质或核酸键合的金属中心的取代反应则复杂得多，其原因是进入的配体与金属中心附近基团的相互作用，以及这些反应的偶合改变了大分子的构象。

2.2.c　电子转移反应

电子转移到过渡金属离子，或者从金属离子转移出来，可用内界机理和外界机理两种反应途径来描述。内界电子转移反应的特点，是存在一个或多个直接与反应物配位层相连的桥式配体。内界电子转移反应的一个经典例子由 2.2 式表示，其中，活性的 Cr(Ⅱ) 配合物转移一个电子到惰性的 Co(Ⅲ) 受体，后者被还原成活性的产物 Co(Ⅱ) 配合物：

$$[Co(NH_3)_5Cl]^{2+}+[Cr(H_2O)_6]^{2+}\xrightarrow{5H^+}[Co(H_2O)_6]^{2+}+[Cr(H_2O)_5Cl]^{2+}+5NH_4^+ \qquad (2.2)$$

同时生成惰性的 Cr(Ⅲ) 配合物。氯离子从 Co(Ⅲ) 转移到 Cr(Ⅱ) 中心这一特征反应，证明了电子转移反应的过渡态包含有桥连的双核配合物，如图 2.3 所示。在这一桥连配合物中，电子转移比原子转移快，因此，氯离子仍保留在动力学惰性的 Cr(Ⅲ) 产物的配位层中。在外界电子转移反应机理中，两个氧化还原对相互接近，并和它们所缔合的溶剂分子形成所谓的“前驱配合物”。这样，电子转移反应并没有伴随氧化剂和还原剂配位层之间的配体交换。

我们至今还不知道涉及一对金属蛋白间的内界电子转移反应。虽然这样的内界机理不能完全排除，但要形成必需的桥联配体过渡态，蛋白质的空间位阻是很难克服的。金属蛋白分子间或分子内存在金属中心，而金属中心之间的电子转移反应是目前极受关注的课题。长程电子转移反应能以相当大的速率（$>10\,s^{-1}$），在高达约 30 Å 的距离内发生。

Marcus 提出了一个在外界电子转移反应中，对平衡和速率关系有意义的理论。用这一理论预示的小分子二级反应速率常数和实验结果非常符合。这一理论预示：电子转移反应应该有

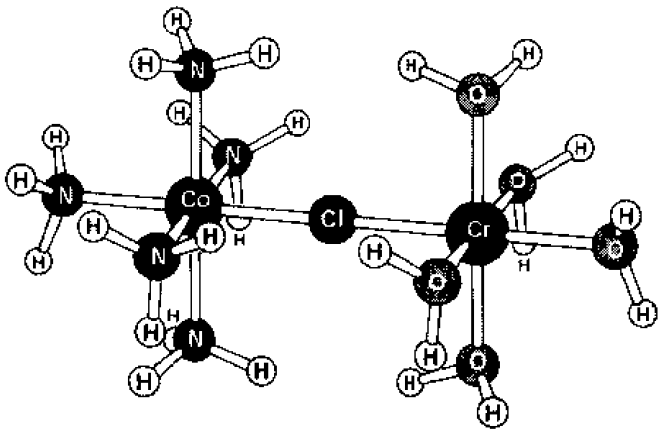


图 2.3 $[Co(NH_3)_5Cl]^{2+}$和$[Cr(H_2O)_6]^{2+}$间内层电子转移反应形成的双核氯桥中间体结构

一个最优驱动力(optimal driving force)。当使反应自由能比这一数值有利时,反应速率反而减小,而不是增加。对小分子反应,这一所谓的"反向区域"(inverted region)已经在实验中观察到,最近在涉及金属蛋白的电子转移反应中也发现类似情况。

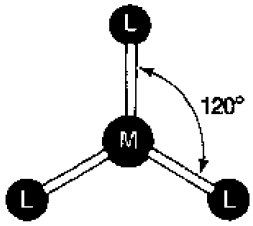
2.3 生物体中金属离子的电子结构和几何结构

表 2.6 列出了生物体中金属离子的常见氧化态,以及过渡金属离子相应的 d 电子组态。d 电子组态是用金属的原子序数(Z)减去形式氧化态,再减去前一个稀有元素的电子数(通常是 Ar,$Z=18$),最后得到 d 电子数。例如,Fe(Ⅱ)有 d^5 电子组态($26-3-18=5$),Mo(Ⅵ)是 d^2 组态的离子($42-4-36=2$),Cu(Ⅰ)是 d^{10}($29-1-18=10$),等等。图 2.4 给出了最常见的、配位数3～6的配位几何构型,生物无机化学中常碰到这样的金属配合物构型。如前所述,明显偏

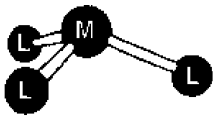
表 2.6 生物无机化学中重要元素的常见氧化态

金 属	氧化还原态	d 电子数	金 属	氧化还原态	d 电子数
Na	(Ⅰ)		Tc	(Ⅰ)	6
K	(Ⅰ)		Fe	(Ⅱ)	6
Mg	(Ⅱ)			(Ⅲ)	5
Ca	(Ⅱ)		Co	(Ⅰ)	8
V	(Ⅲ)	2		(Ⅱ)	7
	(Ⅴ)	0		(Ⅲ)	6
Cr	(Ⅲ)	3	Ni	(Ⅱ)	8
Mo	(Ⅱ)	4	Cu	(Ⅱ)	9
	(Ⅲ)	3		(Ⅰ)	10
	(Ⅳ)	2	Zn	(Ⅱ)	10
	(Ⅴ)	1			
	(Ⅵ)	0			
Mn	(Ⅱ)	5			
	(Ⅲ)	4			
	(Ⅳ)	3			

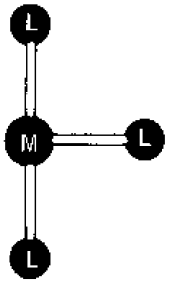
配位数 3



平面三角

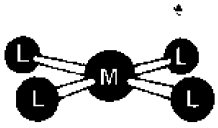


三角锥

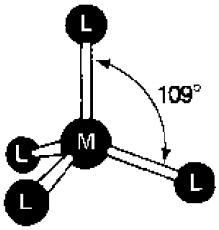


T形

配位数 4

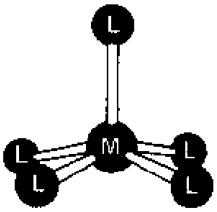


平面四方

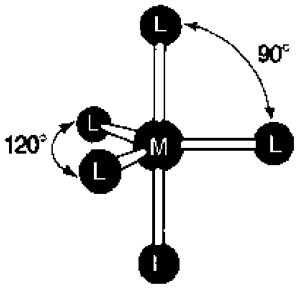


四面体

配位数 5

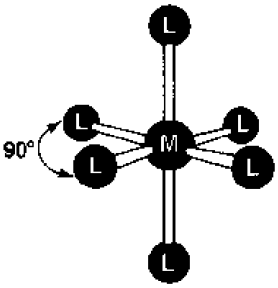


四方锥



三角双锥

配位数 6



八面体

图 2.4　配位数 3～6 常见的几何构型

离这些理想结构的情况是能够存在，而且确实存在的。当某一氧化态的金属离子置于由一组配体组成的配位多面体中心时，配位金属离子与自由金属离子的 d 轨道能级相比会发生改变。涉及配位场分裂的这一现象最好用能级图来描述。能级图揭示了单电子轨道能和配位场强度的依赖关系。

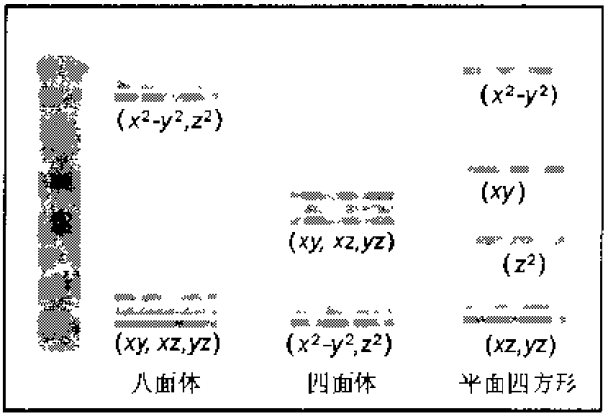


图 2.5　八面体、四面体和平面四方形构型过渡金属配合物的 d 轨道配位场分裂图

八面体配合物的高低轨道能级差规定为 Δ_o，四面体的为 Δ_t

图 2.5 是生物无机金属中心采用的重要结构的配位场分裂能级图。当你想知道蛋白质中金属中心的物理性质（诸如光谱，磁性，电子自旋共振谱等）与它们的结构和反应性的关系时，这些能级图就非常有用。例如，如果你在蛋白质中碰到反磁性（无未成对电子）的 Ni(Ⅱ)时，它必定呈平面四方的几何构型，因为四面体和八面体中的 d^8 配合物都有两个未成对电子，应该是顺磁性的，如图 2.6 所示。金属中心的配位场的强度在很大程度上取决于配体上的这组配位原子。配体使 d 轨道分裂的能力根据下面的“光谱化学序列”顺序而变化：

$$I^- < Br^- < S^{2-} < Cl^- < NO_3^- < OH^- \approx RCOO^- < H_2O \approx RS < NH_3 \approx Im(\text{咪唑})$$
$$< en(1,2\text{-乙二氨}) < bpy(2,2'\text{-联吡啶}) < CN^- < CO$$

这一序列对判断电子组态是高自旋还是低自旋很有意义，因为在某些情况下有存在两种自旋的可能性。

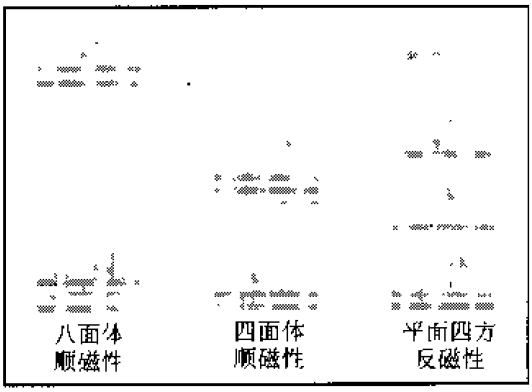


图 2.6　具有八面体、四面体和平面四方构型的 d^8 Ni(Ⅱ)配合物的配位场分裂图、轨道占据情况及磁性

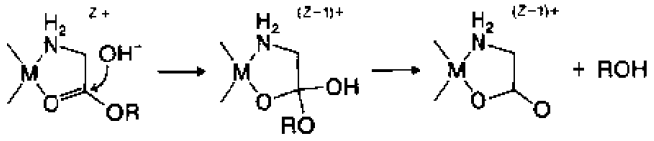
除了在生物无机化学中金属离子有特定的电子结构外，它们也具有对波谱研究十分有利的原子核性质。用于这一研究领域的实验方法将在第 4 章讨论。这样，就有可能在金属蛋白中突出一个完全定域的金属中心区，测试它们的磁性和波谱性质。因此，这样的金属中心是淹没在更难鉴定的有机残基汪洋大海中的独特功能团。

2.4 配合物中配体的反应性

必须记住，具有改变配位对外界底物反应性能力的金属离子，在生物体中起催化中心的作用。配体酸性的增强作用就是这样的反应。如同表 2.2 所示以及 2.1.c 所讨论的，已配位的水分子或其他配体分子的 pK_a 值比自由配体的 pK_a 值低，原因是在配位情况下，带正电荷的中心金属能稳定共轭碱的氢氧根（见 2.3 式）：

$$M(H_2O)_n^{Z+} \longrightarrow M(H_2O)_{n-1}(OH)^{(Z-1)+} + H^+ \qquad (2.3)$$

增加底物分子对亲核进攻的敏感性，是与金属蛋白中金属中心相关和重要的生物功能。属于这种类型的生物过程有酸酐、酯、磷脂和 Schiff 碱的水解，羧化和脱羧反应，以及氨基转移作用等。金属中心如何起 Lewis 酸作用，其中一个例子是中性 pH 下氨基酸酯的水解。从 2.4 式可见，带正电的金属离子的配位促进了羰基上的亲核进攻：



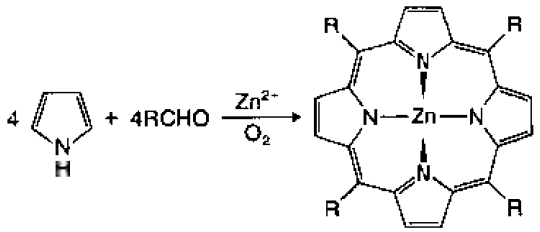
(2.4)

这一反应的速率按

$$M = Cu^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Ca^{2-} \sim Mg^{2+}$$

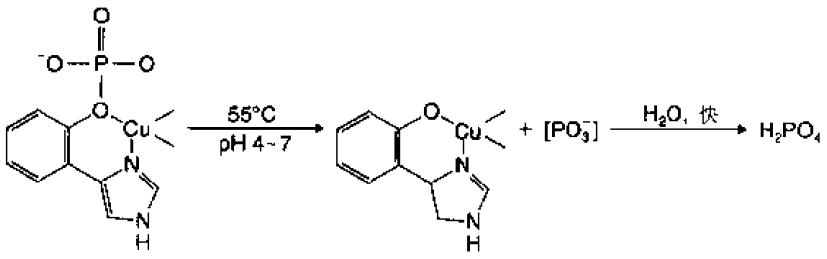
变化，和 Irving-Williams 序列的倾向性一致。在中性 pH 下未催化的反应基本上无法观察到。

由金属中心促进的反应还包括：模板效应，离去基团反应性的增强作用，N_2 和 O_2 等小分子的活化，以及化学反应性被配位作用掩蔽。模板效应是指金属在缩合反应中起组织反应的作用，例如 2.5 式给出的实验室合成卟啉环反应：



(2.5)

倾向于四面体立体化学的锌用于这一反应，促使卟啉环中的金属移出，生成自由卟啉碱。2.6 式给出了磷脂水解的反应，铜离子对离去基团的配位促进了水解作用：



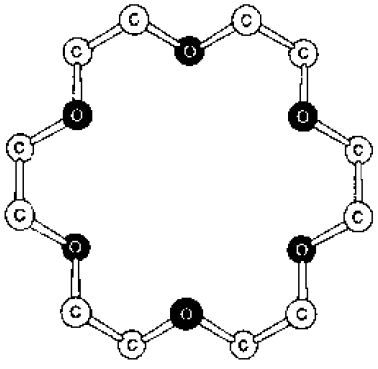
(2.6)

在这一生物模拟化学过程中，当 pH 为 4～7 时，金属中心可使 2-(咪唑基-4)苯基磷酸酯的水解反应速率加快 10^3～10^4 倍。

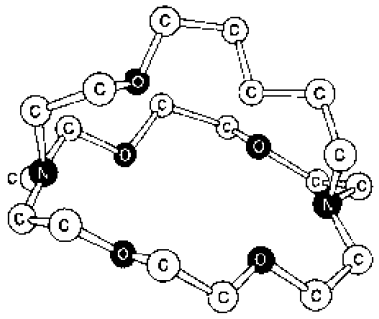
2.5 模型配合物和自发自组装概念

由于金属生物高分子的尺寸大，因此，很难获得金属配位层高分辨结构信息。这类分子结构复杂，其他物理性质有时也很难测试，而且在金属蛋白中有不同的金属部位，其中某些特殊金属中心的氧化还原电位也同样难测。研究金属离子在生物高分子中的反应性也具有类似的挑战性，虽然现在可用定点诱变(site-directed mutagenesis)的方法来实现这一研究目标，但系统地修饰配体，以便检验假定的反应机理是否合理也很困难。综上所述的原因，生物无机化学家常常合成和研究模型配合物，尽可能真实地复制生物高分子中金属中心的物理和化学性质。例如，如果知道金属中心的结构，通过 X 射线晶体结构测定，就可能设计出完全复制配位环境的模型配合物。这样的模型配合物被称为复制模型(replicative model)。如果配位环境未知，则模型配合物研究给生物无机化学家提供了一个检验假设结构的机会，这样的模型可称为推测模型(speculative model)。在这两类模型研究中，都试图用模型解释生物分子的物理或化学性质，为了防止对从模型中获得的信息过度解释，正确的判断是非常重要的。要做到这一点，最基本的是要知道模型配合物的结构，最好能从单晶 X 射线衍射实验中得到。模型研究对深入探索金属生物化学的结构和机理很有意义，其中包括：对蛋白质中金属原子簇内金属电荷(或氧化态)的表征或确定，距离和介质对电子转移速率的影响，促进血红蛋白铁中心双氧可逆结合的空间因素和电子因素的作用，以及在多种酶促催化反应中鉴别可能产生的中间产物等。然而，还应该指出，生物金属中心的发现和表征也同样推动了配位化学的发展。换句话说，这一作用是相互促进的，两者都是生物无机化学研究领域进步的重要组成部分。

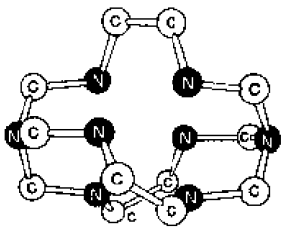
在设计模型配合物时，可采用多样性的策略。“自发自组装”就是已得到承认的一种方法，它涉及金属和最简单的配体间的反应，配体中包含已知的或假定的生物配位原子，以生成预期



(a) 18-冠-6,冠醚



(b) 2.2,2-穴醚，穴醚



(c) 墓穴包合物(sepulchrate)

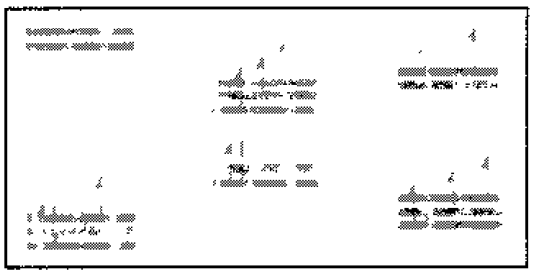
图 2.7 大环配体

的复制分子。这种方法的原理是：自然界在生物圈进化过程中，模仿岩石圈中的化学过程，用类似的策略组装这样一个金属中心。在复制已知的金属蛋白核心结构研究方面，例如铁硫蛋白中的$\{Fe_nS_n\}^{m}$簇和双铁-羧酸酯蛋白中的$\{Fe_2O(O_2CR)_2\}^{2+}$核心，自发自组装研究已获得了成功。这些成就使得有人认为"自发自组装"是"碰巧"，但这样的指责忽略了一个重要问题。如前所述，大部分生物无机中心的金属-配体之间的化学键是活性的。因此，合成模型配合物的化学过程几乎都是受热力学控制，而非动力学控制下进行的。仅仅因为无机合成化学家在实验台上的战术和技巧，这些通常为结晶固体形式的分子，常常成为金属和配体间形成的多种化合物混合体系的主要组分。精心选择溶剂、抗衡离子、配体的空间结构特性以及温度，可避免不必要的副产物生成。用这样的技巧把简单配体组装成预期的模型化合物，在可能生成的配合物混合体系中，这种模型化合物在热力学上是最稳定的物质，与此相反，由于碳-碳键和金属-碳键的惰性大，大部分有机和金属有机化合物的合成通常是在动力学控制下进行的。

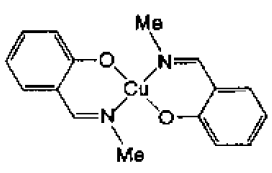
虽然自发自组装得到了对金属蛋白核心的结构和光谱性质很有用的模型配合物，但复制功能性化学则要求更复杂的配体。像冠醚、穴醚、墓穴包合物(sepulchrate)(图 2.7)和其他大的多环分子等区域化配体(compartmentalized ligand)的发展，为模拟金属蛋白核心化学提供了多种新思路。多肽合成的结构设计是另一个发展很快的领域，很可能对生物无机模型化学的研究起重要作用。然而，不论配体设计得多好，金属蛋白核心化学的微妙和复杂不能完全被复制，就此而言，模型研究将受到限制。总之，自然界造就了复杂的分子，以获得如表 1.1 中所列举的特殊功能。归根到底，对生物分子的直接研究是无可替代的。

习　题

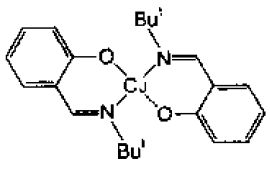
1. 计算下列配合物的 d 电子数：
   (a) $[Fe(CN)_6]^{3}$，(b) $[CoCl_4]^{2}$，(c) $[Ca(OH_2)_6]^{2+}$，(d) $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$。
2. 铀氧基离子(UO_2^{2+})通常用来形成 X 射线研究用的重原子衍生物。这是一个相对硬的离子，你估计哪一类官能团能被衍生？与另一类重金属离子 Hg^{2+} 的衍生物相比，其化学行为有何不同？
3. 指出下列 3 个 d 轨道能级图与配合物$[Fe(OH_2)_6]^{2+}$、$[Fe(CN)_6]^{4-}$、$[FeCl_4]^{2-}$的对应关系。



4. 亚铬离子$[Cr(OH_2)_6]^{2+}$是一个很好的还原剂。用它处理电子转移蛋白的氧化型，结果把蛋白质转变为还原形式。生成的 Cr^{3+} 和蛋白质结合很紧。请解释这一现象。
5. 下面两个铜配合物中，哪一个(Ⅰ或Ⅱ)有更低的还原电位(更难还原)，为什么？



Ⅰ



Ⅱ

参 考 文 献

一般无机化学

F. A. Cotton and G. Wilkinson. 1988. *Advanced Inorganic Chemistry,* 5th ed. Wiley-Interscience, New York.

B. Douglas, D. H. McDaniel, and J. J. Alexander. 1983. *Concepts and Models of Inorganic Chemistry,* 2nd ed. Wiley, New York.

J. E. Huheey, E. A. Keiter, and R. L. Keiter. 1993. *Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity,* 4th ed. Harper Collins, New York.

S. M. Owen and A. T. Brooker. 1991. *A Guide to Modern Inorganic Chemistry.* Wiley, New York.

D. F. Shriver, P. Atkins, and C. H. Langford. 1994. *Inorganic Chemistry,* 2nd ed. W. H. Freeman, New York.

电子结构

R. L. Dekock and H. B. Gray. 1989. *Chemical Structure and Bonding,* 2nd ed. University Science Books, Mill Valley, CA.

B. N. Figgis. 1966. *Introduction to Ligand Fields.* Robert E. Krieger, Melbourne, FL.

H. B. Gray. 1973. *Chemical Bonds: An Introduction to Atomic and Molecular Structure.* Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA.

L. E. Orgel. 1966. *An Introduction to Transition Metal Chemistry: Ligand Field Theory,* 2nd ed. Wiley, New York.

稳定性和反应性

F. Basolo and R. G. Pearson. 1967. *Mechanisms of Inorganic Reactions,* 2nd ed. Wiley, New York.

K. Burger, ed. 1990. *Bio Coordination Chemistry: Coordination Equilibria in Biologically Active Systems.* Ellis Horwood, New York.

H. Irving and R. J. P. Williams. 1953. "The Stability of Transition-Metal Complexes." *J. Chem. Soc.,* part III, 3192~3210.

D. Katakis and G. Gordon. 1987. *Mechanisms of Inorganic Reactions.* Wiley-Interscience, New York.

R. G. Wilkins. 1991. *Kinetics and Mechanisms of Reactions of Transition-Metal Complexes,* 2nd ed. VCH, Weinheim.

在蛋白质和模型中的配位点

J. P. Glusker. 1991. "Structural Aspects of Metal Liganding to Functional Groups in Proteins," in C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, D. Eisenberg, and F. M. Richards, eds., *Advances in Protein Chemistry,* Volume 42. Academic Press, San Diego, 1~76.

J. A. Ibers and R. H. Holm. 1980. "Modeling Coordination Sites in Metallobiomolecules." *Science* 209, 223~235.

K. D. Karlin. 1993. "Metalloenzymes, Structural Motifs, and Inorganic Models." *Science* 261, 701~708.

第 3 章　生物分子的性质

3.1　蛋白质及其构成
3.2　核酸及其构成
3.3　结合金属的其他生物分子

在生物无机化学中配体往往是指一些氨基酸的侧链或核酸成分。由这些残基所展示的配位环境的关键，依赖于蛋白质的三维折叠和核酸的三级结构。决定较为复杂结构的要素，例如在细胞膜基质内蛋白质的定位或染色质中核小体核心蛋白对 DNA 的组装，都能调节生物大分子与金属结合的能力。本章宗旨就是给出与此论题相关的基础知识，这对更好地理解后面章节中所表述的原理是很有必要的。此外，源于分子生物学相关的基因克隆及表达的基础概念和酶反应动力学的基本原理也将被阐述。

3.1　蛋白质及其构成

3.1.a　天然存在的氨基酸

蛋白质由 20 个必需氨基酸组成，其中许多氨基酸具有适于金属离子配位的供体原子。图 3.1 列出 pH 7 时氨基酸侧链的结构。碱性和酸性侧链的 pK_a 值概括于表 3.1。如同第 2 章所述，在这些位置上金属配位能充分地减少有效 pK_a 值。氨基酸侧链自 C_α 碳原子伸展，自然界发现的氨基酸的手性(chirality)几乎总是 S 型(或 L 型)。蛋白质通过肽键连接的氨基酸构成主链。这些肽键则是那些经常处于反式构型的平面单元。

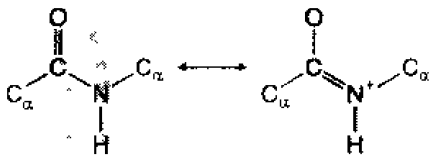


表 3.1　氨基酸碱性和酸性侧链的 pK_a 值

氨基酸	侧　链
精氨酸	12.48
天冬氨酸	3.65
半胱氨酸	8.35
谷氨酸	4.25
组氨酸	6.00
赖氨酸	10.79
酪氨酸	10.13
α-COOH	≈2.2
α NH_3^+	≈9.5

蛋白质中的氨基酸残基自氨基末端开始按顺序编号。每个氨基酸除了使用通常的三字母代码表示以外，还可标出单字母代码(例如，Histidine = His 或 H ; Aspatic acid = Asp 或 D)，如图 3.1 所示。利用基因密码，大量地扩大了已知蛋白质序列的数目。随着 DNA 测序技术的进步，单字母代码的使用已经趋于普遍。伴随着这种信息剧增，缩短早先或许已较熟悉的三字母代码是很必要的。

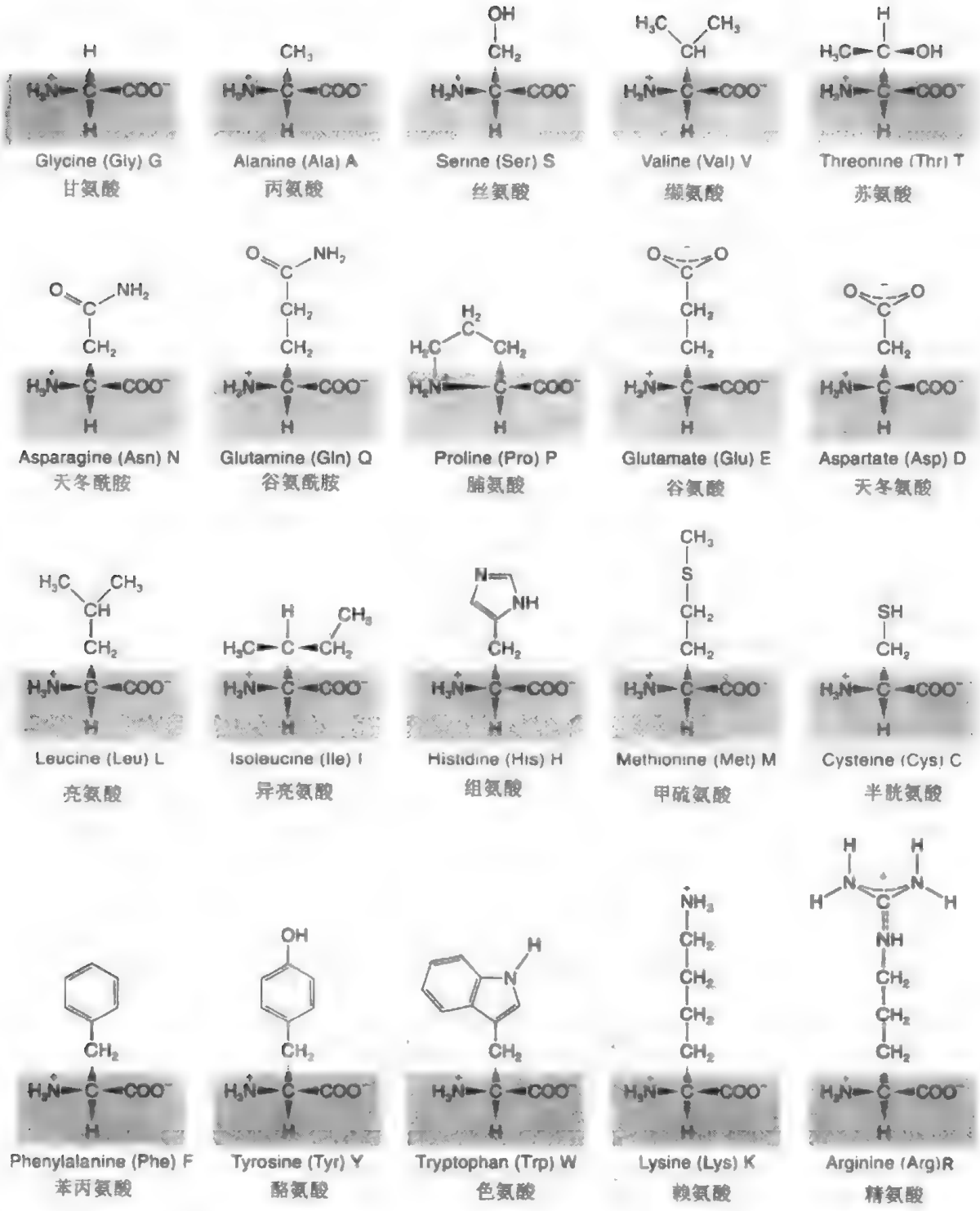


图 3.1　20 种常见氨基酸结构及字母代码

3.1.b　作为配体的蛋白质

通常体现配体功能的氨基酸以及它们的反应模式见图解 3.2，其最为常见的侧链配体是半胱氨酸的硫醇基、组氨酸的咪唑、谷氨酸和天冬氨酸的羧酸基、及酪氨酸的苯酚基。除酪氨酸外，每个上述氨基酸都被观察到在两个金属离子之间充当桥联配体，或作为单个金属离子的末

端配体。丝氨酸或苏氨酸的羟基、甲硫氨酸的硫醚基、谷氨酰胺和天冬酰胺的羧酰胺基、赖氨酸的氨基、以及精氨酸的胍基较少作为金属的给体。除了侧链的给体原子以外，金属离子也可接到肽链的羰基、去质子肽键氮原子、N-端氨基和 C-端的羧基上。

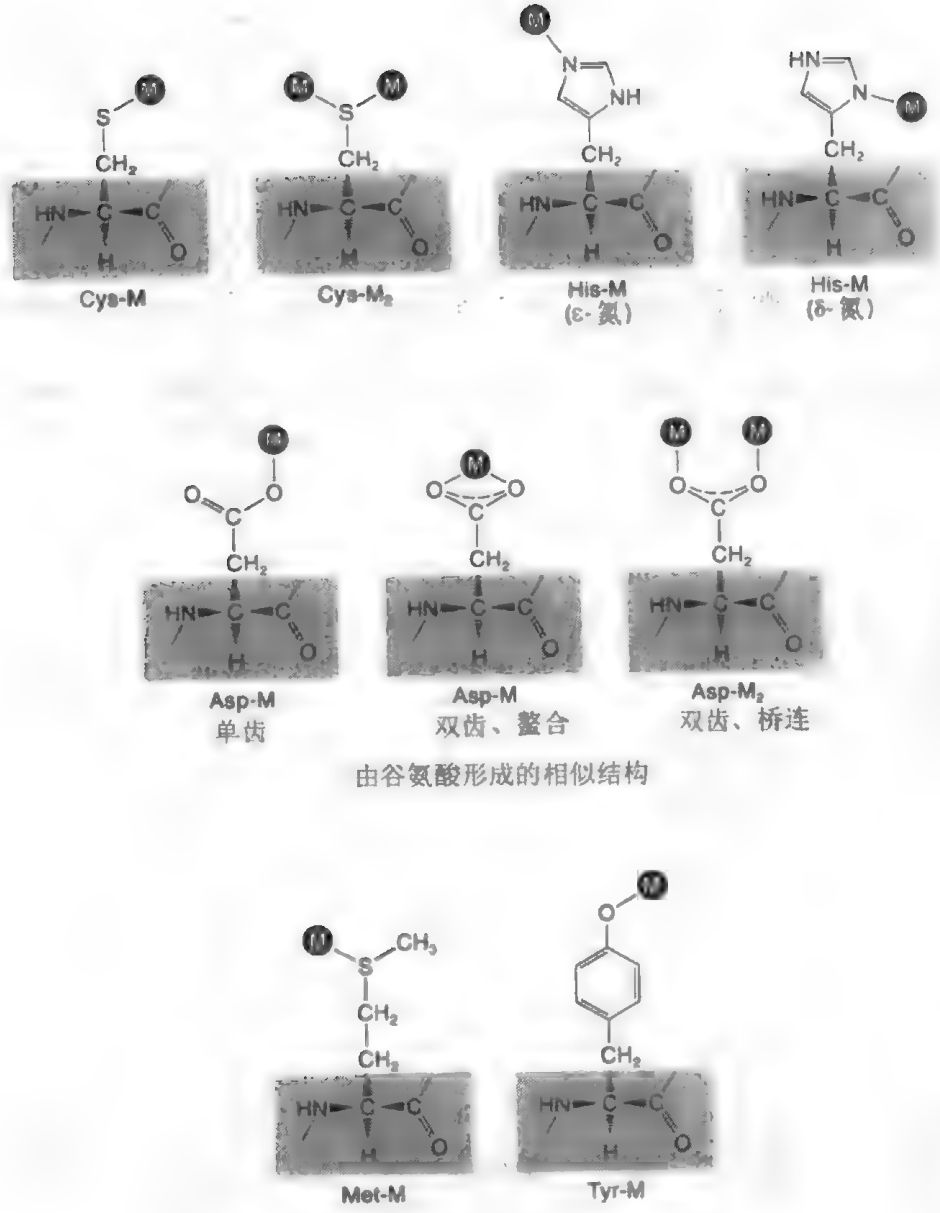


图 3.2　氨基酸侧链与金属离子结合模型

3.1.c　蛋白质的结构

在金属蛋白中一系列配体给体原子的空间取向关键依赖于它们的三维结构。而此结构则完全取决于该蛋白质的氨基酸序列。肽键折叠成独特的三维结构依靠许多力的作用 。其中主要包括疏水表面彼此相对地朝向蛋白质内部进行的堆积，以避免与极性溶质环境相互作用；特定的氢键及离子键的形成，以及因二硫键或氨基酸侧链与金属离子配位效应导致的共价交联的形成。蛋白质结构可以在 4 个水平上描述：一级结构(primary structure)只涉及确定的氨基

酸序列的共价键，正如图 3.3 所示。二级结构(secondary structure)系指扩展到一些邻近氨基酸基团的局部构象，它往往取决于特定氢键模式。二级结构中最常见的单元是右手 α-螺旋(α-hellix)、平行或反平行 β-折片(β-pleated sheet)及各种形式的扭转(turn)。这些单元展示于图 3.4。三级结构(tertiary structure)一词是用来描述生物高聚体链产生十分精确的折叠。几个金属蛋白的三级结构在图 3.5 中有详细描述。最后，四级结构(quaternary structure)系指不同多肽链聚合成更大的集合体。这些高度有序的结构将于 3.1.d 节中讨论。

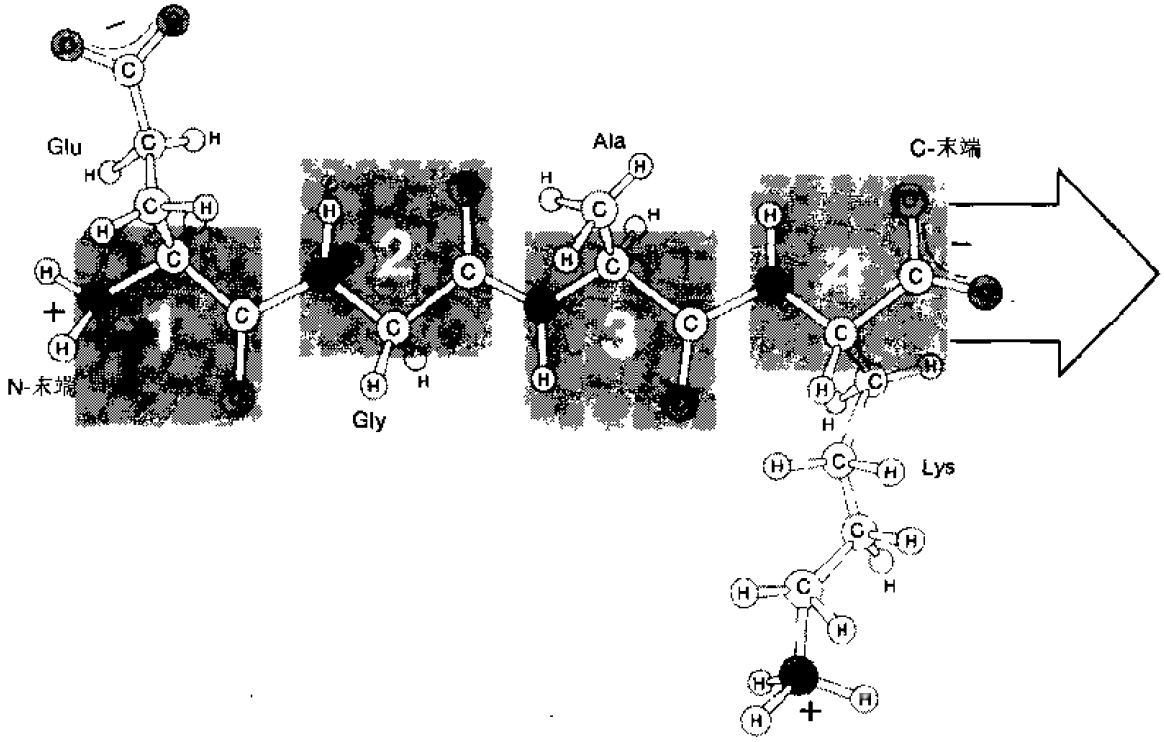


图 3.3　蛋白质一级结构

氨基酸沿多肽链由氨基端向碳端排列编号

金属蛋白折叠过程对金属的依赖性变化不一。如铜蛋白的质体蓝素(plastocyanin)，对它脱金属蛋白部分结构的研究揭示：除去金属离子几乎不引起它结构改变。金属结合部位是由蛋白质三级结构预先精确组装而成，它即使在没有金属结合的状态下仍相当稳定。相反，对应于“锌指”结构域的多肽，光谱学和化学数据分析指出：这种脱金属肽无一定的二级或三级结构，以随机卷曲形式存在。在有 Zn^{2+} 或其他金属离子存在时，则可维持高度稳定的三维结构。最后，正如像调钙素(calmodulin) 和肌宁蛋白 C (troponin C)这样的 Ca^{2+} 结合蛋白，它们存在某种中介状态，这种状态下与金属离子的结合将促使其从介于三级结构的部分折叠形式转变成稍许不同的、更彻底的折叠形式。

虽然依据金属蛋白的氨基酸序列来预测金属结合部位很是诱人，并且有时也是行之有效的，然而经验告诉我们误差也往往由此而生。以图 3.6 为例，我们看到在 8-铁的铁氧还蛋白(ferredoxin)中结合并维持 2 个 $\{Fe_4S_4\}$ 核的半胱氨酸的硫原子并不对应于来自各自一级结构中的 4 个半胱氨酸残基。

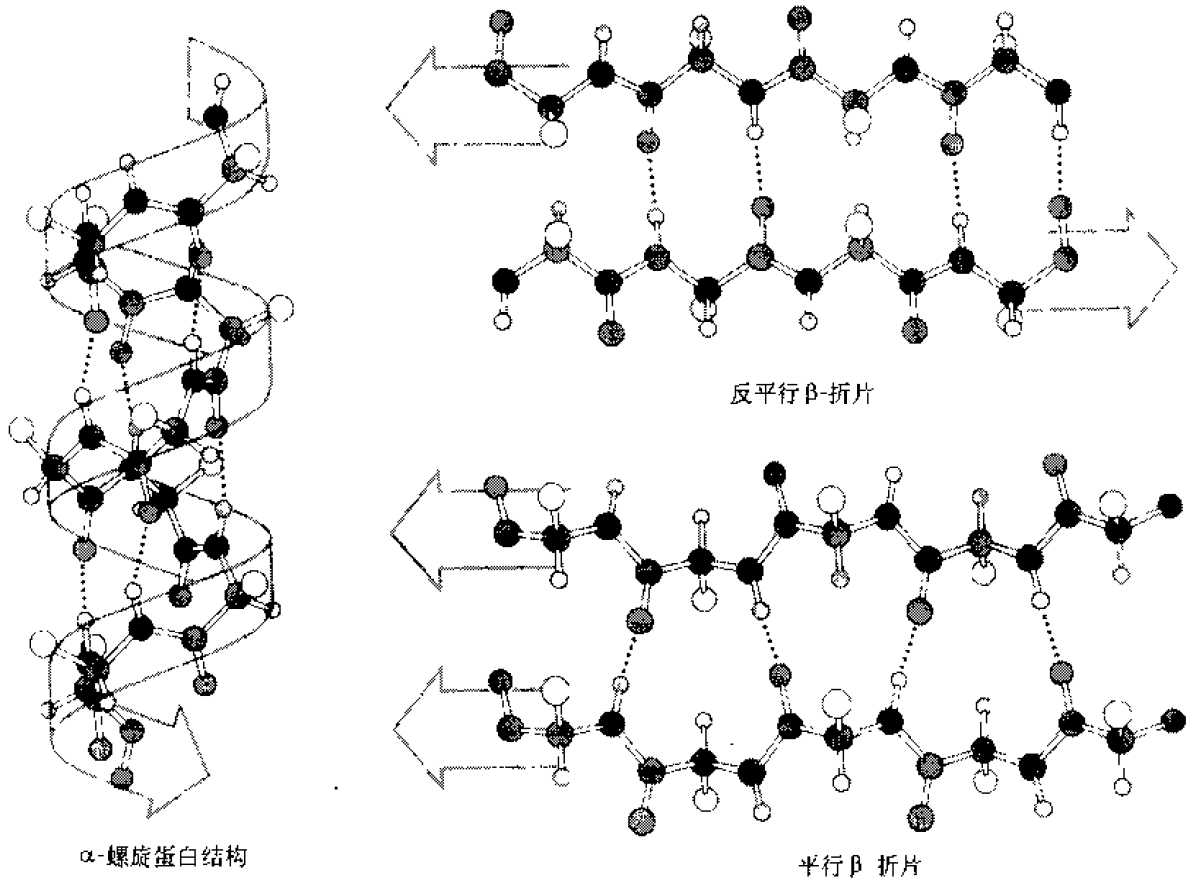


图 3.4　蛋白质二级结构

最常见的模式：α-螺旋和反平行或平行β-折片

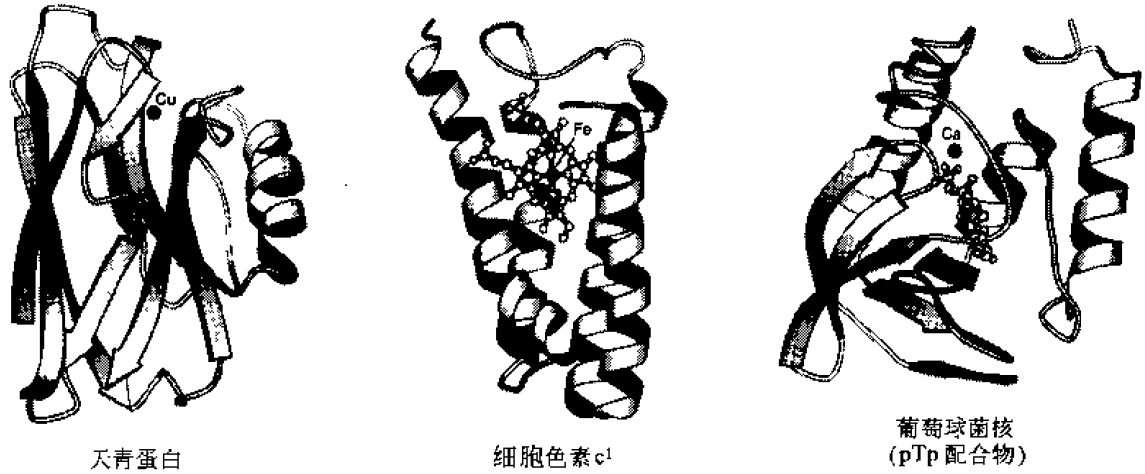


图 3.5　蛋白质的三级结构

三个金属蛋白的空间折叠结构

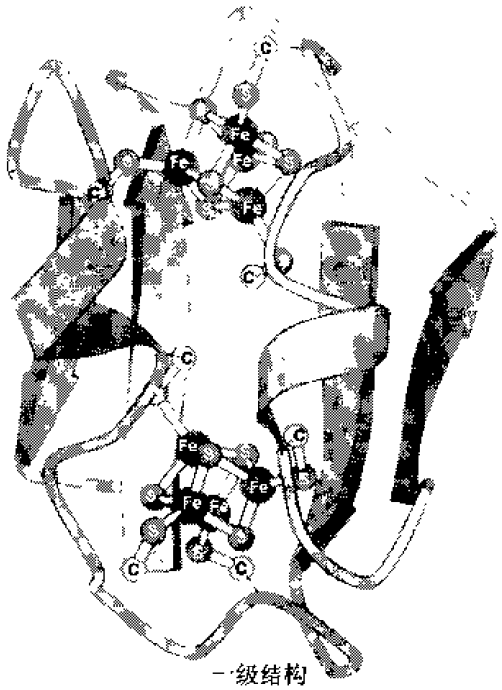


图 3.6　结合 8 个铁的铁氧还蛋白的一级结构和三级结构
虽然一级结构中包括 2 个分开的 CXXCXXCXXXC 系列，每个 Fe_4S_4 立方体都与 2 个富含半胱氨酸残基的序列残基结合

3.1.d　高度有序结构

蛋白质可由几个称为亚基的折叠多肽链构成，它们彼此相互作用形成更大的集合体。蛋白质的四级结构即是其功能的基础，有时也能深刻影响金属结合部位处的结构特征，反之亦然。许多金属蛋白和酶类含有一个以上亚基。例如，铜锌过氧化物歧化酶就是 2 个相同亚基的二聚体 (dimer)，而固氮酶的钼铁蛋白则是由 2 个 α 亚基和 2 个 β 亚基组成的四聚体(tetramer)。我们将在第 7 章看到，锌与酶亚基的结合对于完整的天冬氨酸转氨甲酰基酶(aspartate transcarbamoylase)来说是多么的必要。在第 11 章中，将讨论亚基的相互作用是怎样以协同方式将其结合 4 个氧分子的特殊能力赋予血红蛋白的。

3.1.e　基因克隆与表达对蛋白质的调控

蛋白质的氨基酸组成和序列最终决定了它的结构与功能特征。而氨基酸序列则由构成基因的 DNA 序列所控制。这些精确的基因调控路径正如图 3.7 所示，DNA 序列首先经由 RNA 聚合酶转录成 RNA。大量信号决定了 DNA 序列的转录过程。原核生物无细胞核，转录后的 RNA 直接作为遗传信息被翻译成蛋白质。这种翻译发生在核糖体上，由特殊的 RNA 和蛋白分子组成的大聚合体起到蛋白质合成机器的功能。在真核生物中，细胞有一个核，初始转录的 RNA 经过一个称为拼接(splicing)过程变为成熟的信使 RNA，包括除去 RNA 内的插入序列并使编码区之间相互连接。拼接之所以是必需的，是由于基因组 DNA 中包含着被称为外显子

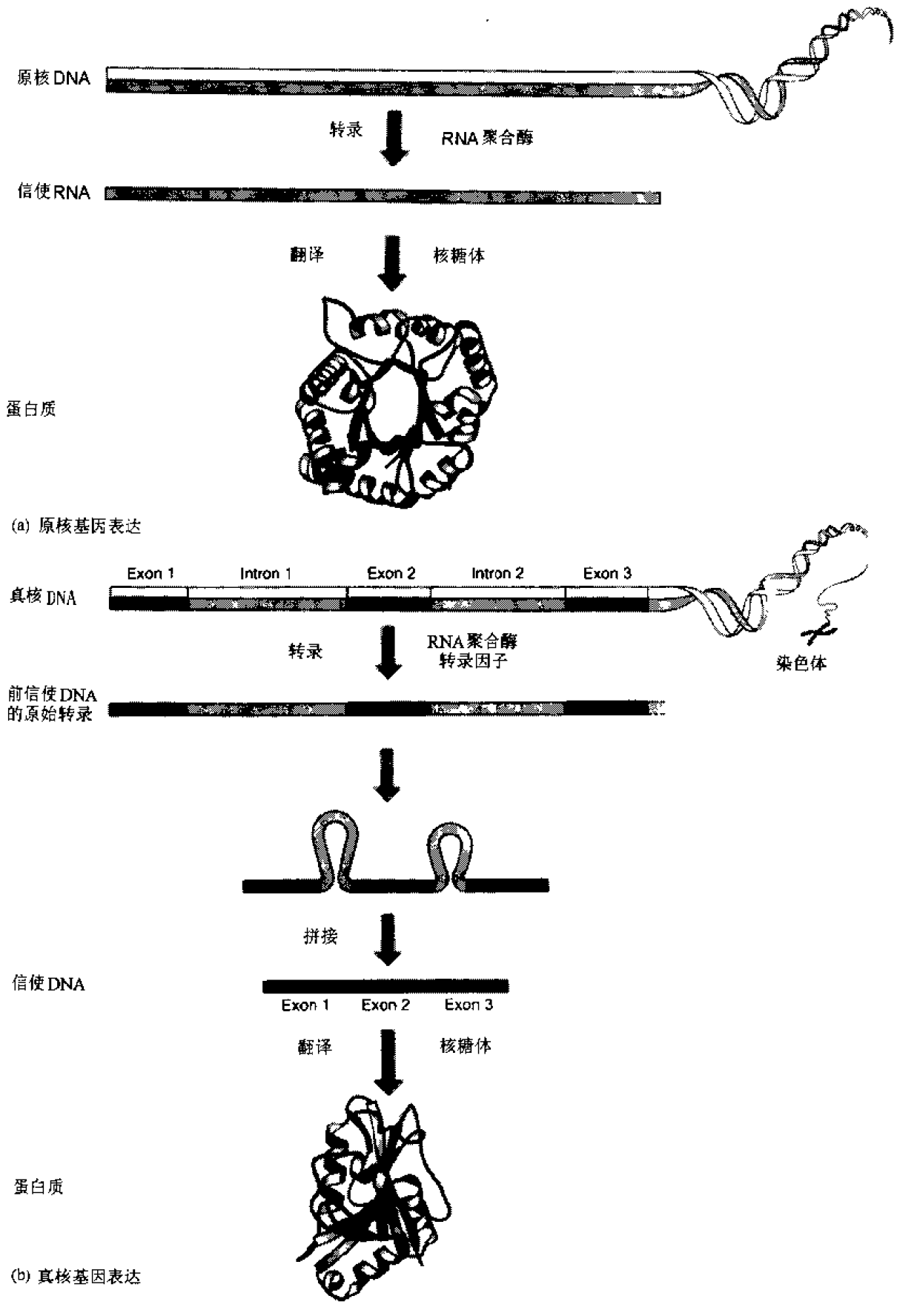


图 3.7　在原核细胞和真核细胞中的基因表达过程

(exon)的区域，这个区域能将最终蛋白质编码并散放在这个区域里，而称为内含子(intron)的区域则没有这个作用，拼接成熟的信使 RNA 才能如同在原核细胞中那样被翻译。

DNA 片段可被克隆化，其过程是将它掺入一个载体(vector)中，即在类型适合的细胞内进行复制的 DNA 区段内。谈到载体，一般系指质粒(plasmid)，为较小的环形 DNA 片段(4000～8000 个碱基对)；或为病毒颗粒，如 λ 嗜菌体。克隆使得用于测序或鉴定的 DNA 区段能够分离。特定基因的克隆常借助于文库(library)来完成。文库系指携带已被克隆了的不同 DNA 片段的载体集合体。文库可依一定方式被导入细胞使每个细胞只含有文库中单一成员。文库中含有目的基因的成员可通过甄别它们核酸序列、及相应的蛋白结构或蛋白功能差异而被筛选出来，即所谓的筛选(screening)。例如，将文库成员导入一株细胞，它缺乏某一种文库所表达的、产生相应蛋白的搜寻基因活性。任何细胞当获得了编码目的基因的文库成员，就将表现出这一它所缺乏的基因活性。这一手段，即所谓经互补进行的克隆，是克隆那些功能已知、但其他信息所知甚少基因的有力方法。

克隆的基因通常可在细胞内以促使目的蛋白大量产生的方式表达，其过程概括如图 3.8。表达过程包括克隆基因到载体，它携带可高水平转录及随后将信使 RNA 翻译成蛋白质所需之全部信息。有时来自真核生物的基因在细菌内被表达，以便进行更细致的生化、结构、和光学方面的研究。

基因的这种表达能够使通过定点突变方式对其结构和功能进行研究。方法学上的发展使得可向基因的核酸序列内引入特定的突变，事实上任何期望对核酸序列及相应的氨基酸序列进行变更都能做到。例如，一个多肽在链 137 位的苯丙氨酸可以被突变为酪氨酸。这个突变体可表示为 Tyr137Phe 或者 Y137F。这一过程给生物无机化学家提供了机会，即对蛋白质内的任何氨基酸残基，包括其金属结合部位或其附近氨基酸进行预期的修饰。虽然这个途径还存在一定局限性，但在方法学上已提供了去探索有关蛋白质内金属结合部位的结构和反应活性假说的有力武器。

3.1.f 酶反应的动力学分析

酶大多是蛋白质，它是促进生物化学转化的催化剂。酶促反应具备着一些独特的属性。其中最重要的当属反应速率的底物-饱和现象，它在 3.1 所示的方程中经由 Michaelis-Menten 模型被简单地描述。

$$E+S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \longrightarrow E+P \qquad (3.1)$$

底物(S)首先结合到酶(E)上形成酶-底物复合体，ES。随即发生化学转变形成酶-产物复合体(EP)，然后它再解离为产物(P)和游离的酶。这一模式解释了曾观察到的底物-饱和行为。

该反应的动力学可由底物浓度的函数，即与反应速率(V)有关的两个参数来描述，如图 3.9 所述。图中的参数 V_{max} 和 K_M 分别表示在底物饱和状态下反应的最大速率和当反应进行到最大速率一半时的底物浓度。虽然趋向于把 K_M 看做酶-底物络合体的平衡常数，但应认识到，K_M 可被相继的反应步骤所影响，这点至关重要。K_M/V_{max} 比率经常被用做酶促反应中有效二级速率常数的量。这一近似值对于比较酶促反应与不具备底物-饱和动力学的非酶促反应是很实用的。

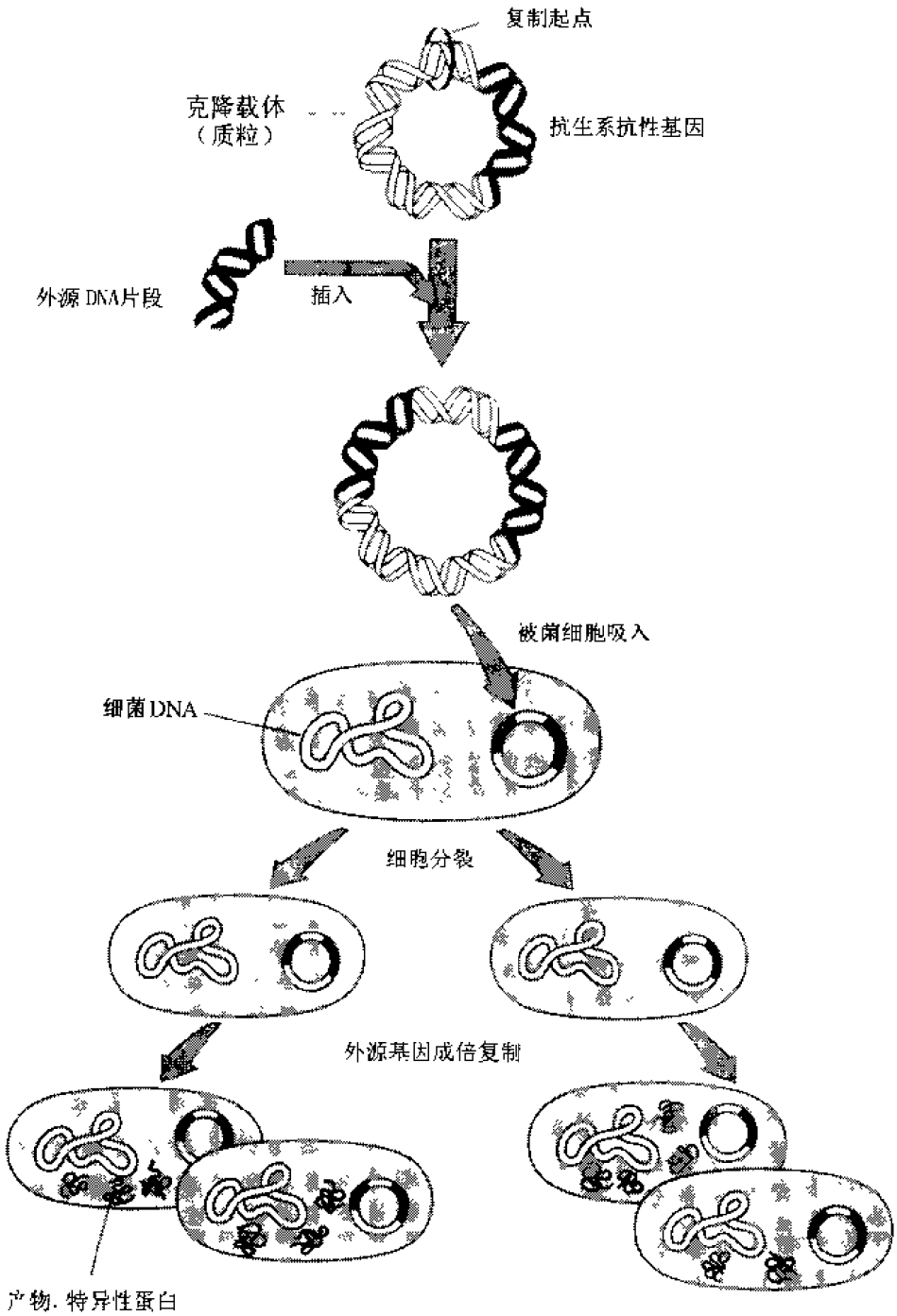


图 3.8　通过含有克隆 DNA 片断的质粒进行的蛋白质超表达流程图

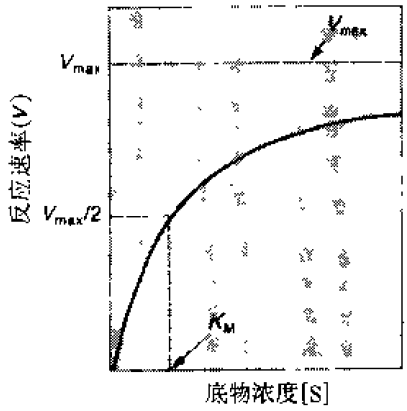


图 3.9 Michaelis-Menten 模型描述的酶促反应动力学中底物与反应速率间的依赖关系

3.2 核酸及其构成

3.2.a RNA、DNA 和它们的构件

核酸分别为 RNA 及 DNA 中的核苷酸或脱氧核苷酸的多聚体。正如图 3.10 所示，磷酸二酯链与邻近的残基相连形成糖-磷酸酯多聚体骨架。通过糖苷键连接到每个糖上的是以下的五种核苷碱基之一：嘌呤：腺嘌呤或鸟嘌呤；嘧啶：胞嘧啶，尿嘧啶(RNA)和胸腺嘧啶(DNA)。不像蛋白质中的平面式肽链连接，核酸中的磷酸二酯键可以经历构象的改变，详见图 3.10 描绘的扭角(torsional angle)。另外的构象络合体(complexity)来自于核糖环内的转角，其中两个基本结构占据着优势，一个是 RNA 的 C3′碳原子(称为 C3′-endo)与 C 5′同位于C4′ O -C 1′所决定平面的同侧；另一个是在 DNA 内 C 2′(称为 C 2′-endo)和 C 5′也是如此。除此之外碱基相对于糖苷键而言能采取顺式及反式构象(图 3.11)。如下面将要讨论的，这些在糖折叠中似乎很细微的差异将在生物多聚体的三级结构和金属结合特征上呈现出戏剧性的结果。

仅由糖和碱基组成的单元被称为核苷，而核苷酸还包含有另外的 5′-或 3′-磷酸基。核苷酸的例子包括三磷酸腺苷(adenosine triphosphate，ATP)，二磷酸脱氧鸟苷(deoxyguanosine diphosphate，dGDP)，以及 3-单磷酸尿苷(uridine monophosphate，3′-UMP)等等。最后一例中，磷酸酯链使核糖的 3′羟基暴露于外。在图 3.12 和 3.13 中绘制了五种核苷酸碱基的结构、它们的编号顺序符合 Watson-Crick 碱基配对反应过程。最后的这一特性系指两条 DNA 链相互连接所构成的双螺旋结构和许多 RNA 的二级结构。有一种很常见的可变模式就是 Hoogsteen 碱基配对，正如在图 3.13 中所展示的。

3.2.b RNA 结构

核糖核酸根据其在细胞内的功能进行分类。信使 RNA(mRNA)携带着来自核内 DNA 的遗传信息到细胞质的核糖体上，并在那里合成蛋白质。核糖体的组成为核糖体 RNA(rRNA)，转移 RNA(tRNA)分子的 3′-末端与氨基酸相连，并将其带给核糖体，在那里将它们转接到增长中的蛋白链上。现在，了解最多的 RNA 就是 tRNA，几种 tRNA 结构特征已由 X-线晶体学方法所测定。在图 3.14 中的就是酵母的苯丙氨酰 tRNA(phenylalanyl，$tRNA^{Phe}$)，这个呈三

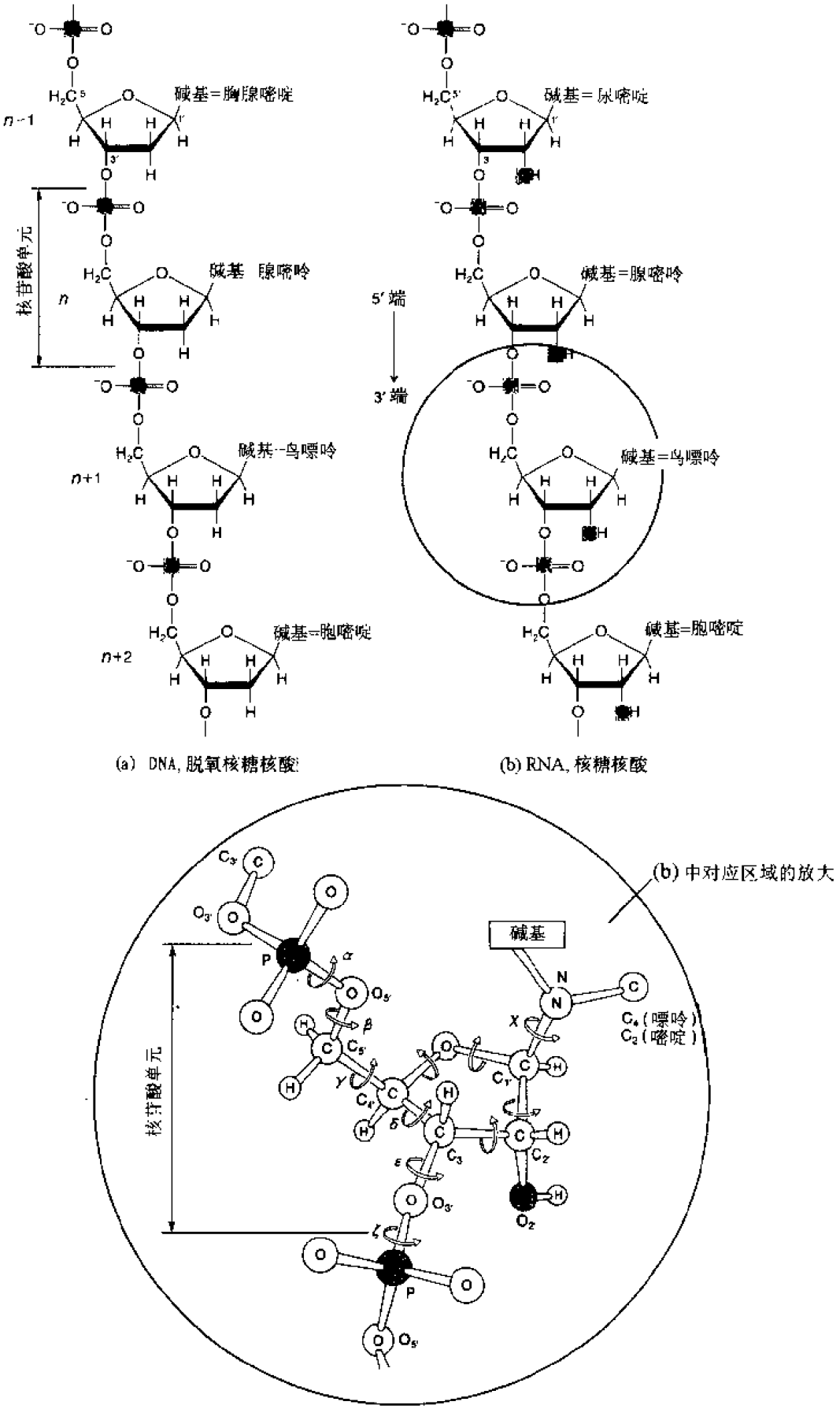


图 3.10　DNA 和 RNA 的磷酸二酯键结构(a,b)及一个核苷酸单元中形成其构象的扭角

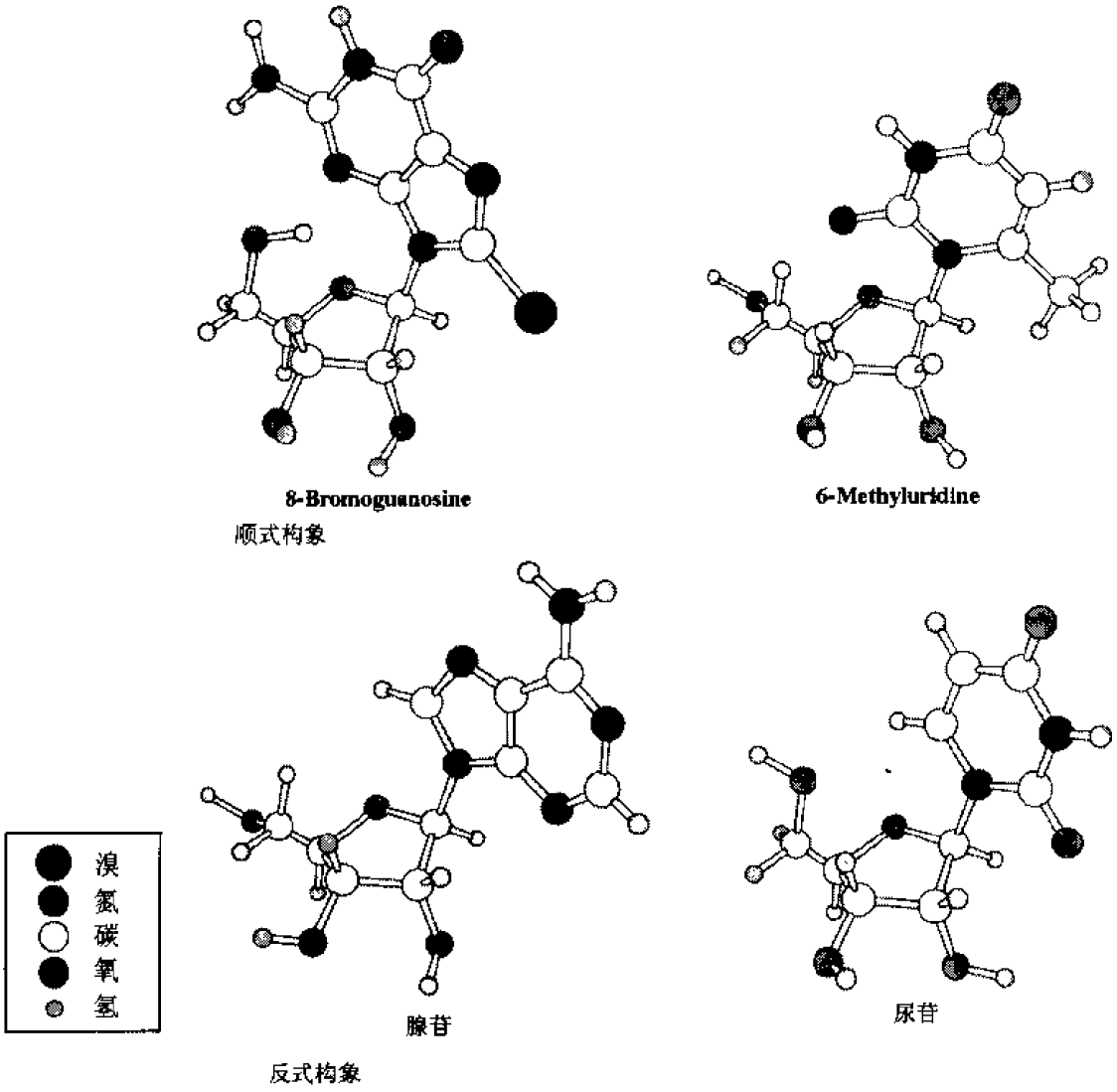


图 3.11　核苷及核苷衍生物以糖苷键为参照的顺反构象结构图

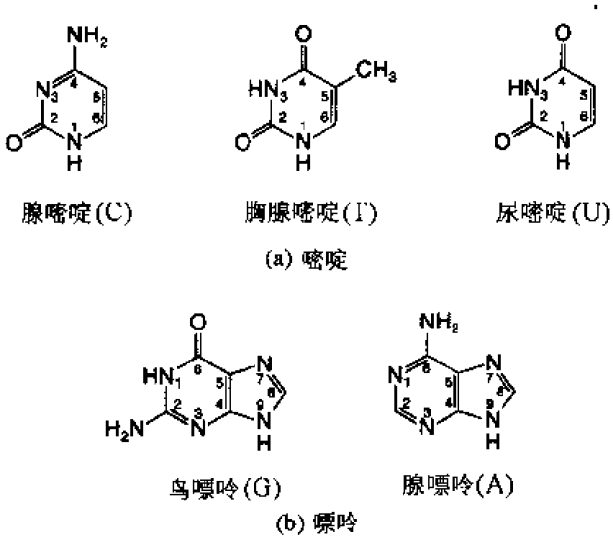
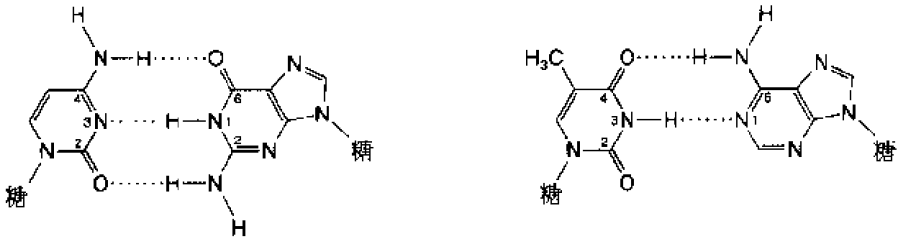
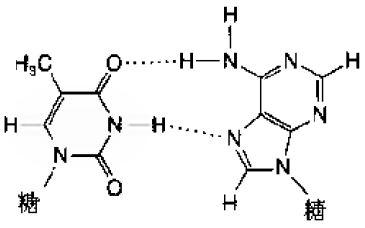


图 3.12　DNA 和 RNA 中的核苷酸碱基的化学结构及其编号



C-G　　T-A

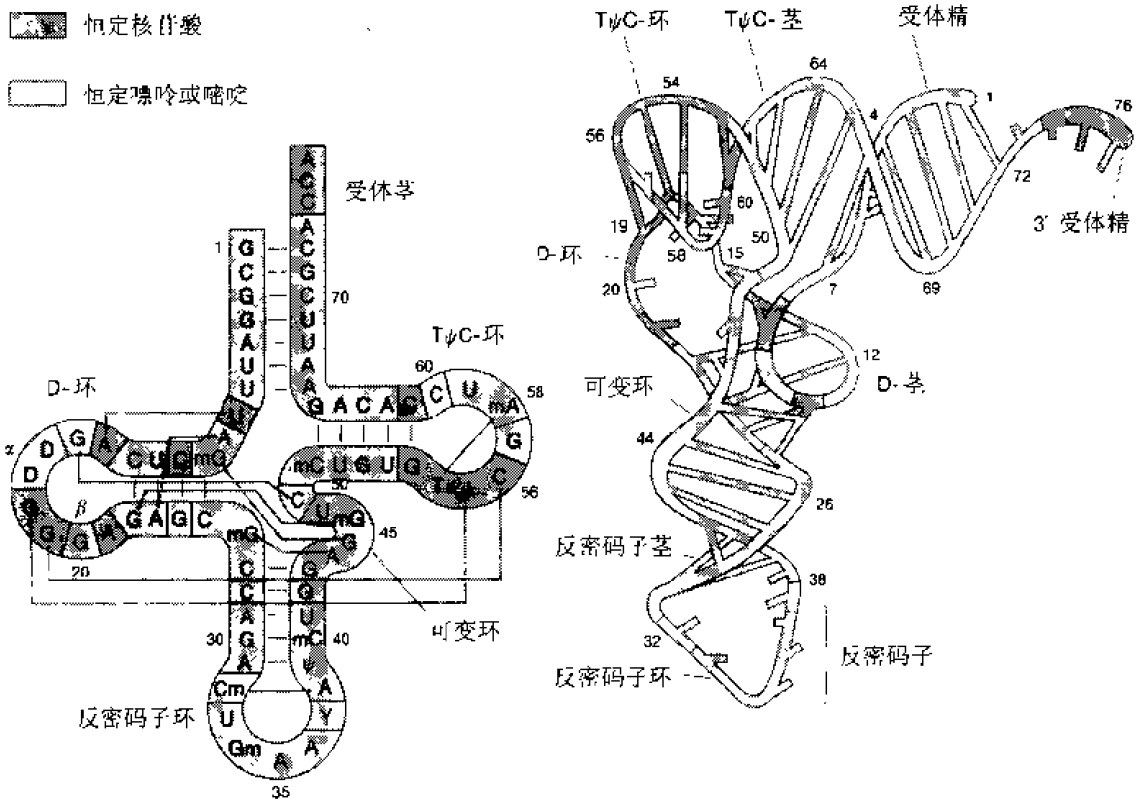
(a) Watson-Crick 碱基配对



T-A

(b) Hoogsteen 碱基配对

图 3.13　核酸中碱基配对图



(a) 一级结构和二级结构　　(b) 三级结构

图 3.14　酵母苯丙氨酸 tRNA 结构图

叶草形的 RNA 分子说明了通过 Watson Crick 氢键配对的 A--U 和 G—C 碱基对决定了 tRNA Phe的二级结构。几个其他 RNA 分子的二级结构也已被确定。测定 RNA 二级结构的最有力的武器之一就是种系发生学上的比较，不同生物的 RNA 序列的同源性是可以比较的。即使实际序列不同，Watson-Crick 碱基配对仍是保守的，所以通常可能构成二级结构的那些区域，诸如发卡环等，可以被归为同类，即同定化(identify)。通过这种比较而推演出的大肠杆

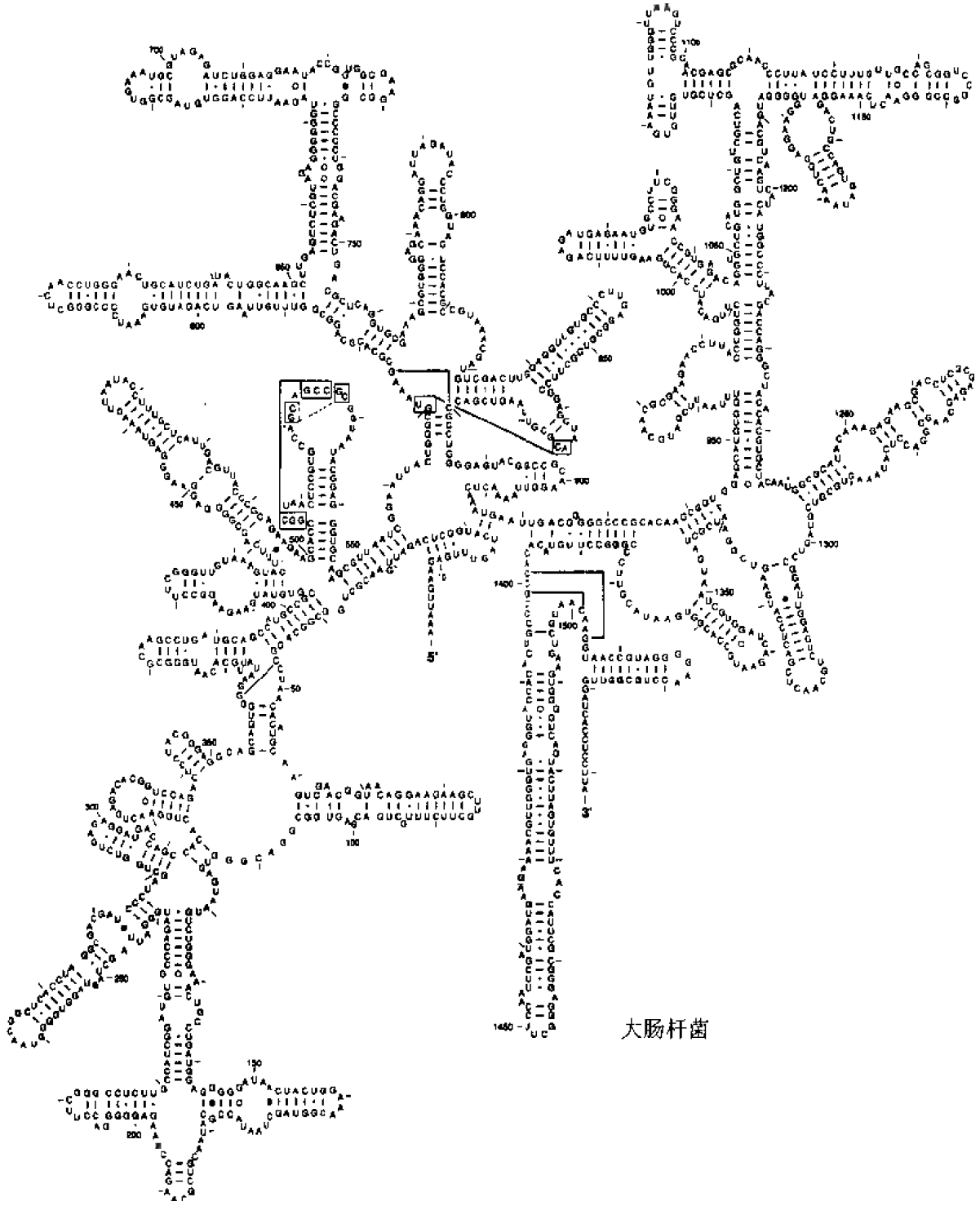


图 3.15　经大量序列比较而推演出的细菌 16S 核糖体 RNA 二级结构

大肠杆菌(由 R. Gutell 提供)

菌(*E. Coli*) 16S 核糖体 RNA 二级结构如图 3.15 所示。这种二级结构经折叠形成了地道的三级结构。与蛋白质很类似,独特的 RNA 分子三级结构在功能上显得非常重要,RNA 分子倾向被认为具有某种酶学功能。这种称为核糖酶(ribozymes)的 RNA 酶需要金属离子激活,这将在 7.2.b 节中进一步讨论。要阐明 RNA 分子的三维空间结构,了解 RNA 折叠规则的发展及核糖酶怎样行使功能在今天分子生物学中是非常重要的。

3.2.c DNA 结构

与 RNA 相比,DNA 的结构相对没那么复杂,却更有趣。它存在着单链和双链形式,我们只讨论后者,因其更常见,也更易于理解。非同源 DNA 的分子量,长度及碱基组成列于表 3.2。DNA 中最常见的结构为 B-型,它是以下列形式为特征的右手双螺旋结构,即:以主槽(major groove)与次槽(minor groove)相互缠绕,平行的 Watson-Crick 碱基以间距 3.4Å,螺距 3.5Å,每周 10.4 个碱基相继堆积,以 C2′-endo 碳原子形式的糖折叠及反向核苷酸构象形式为特征(图 3.11),如图解 3.16 所示。DNA 的第二种结构形式为 A 型,它有 C3′-endo 碳原子糖折叠,较深的主槽,以及不再垂直于螺旋主轴的平行碱基对。Z 型 DNA 是一种有趣的左手螺旋变异型,它的序列具有嘌呤和嘧啶核苷的交替伸展,例如{d(CG)}3;鸟苷的反式构象及不存在深槽。A 型和 Z 型 DNA 展示于图 3.16,并也将三种类型的结构进行了比较。这种序列依赖性的结构和形变性(deformability)的局部差异似乎存在于所有天然的 DNA 中。这种变异能够戏剧性地调节金属络合物与 DNA 的共价键与非共价键反应,并对于蛋白与金属的反应来说也是很重要的。

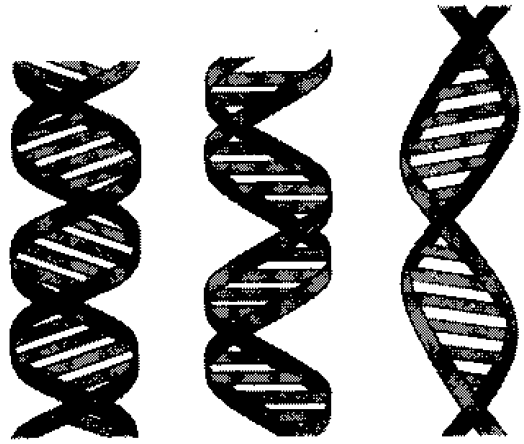
表 3.2 非同源 DNA 的分子量、长度及碱基组成

物 种	大小 (kb)	MW (10^6 Da[①])	GC/AT 含量 (mol%)
病毒			
多瘤病毒	5.1	3.3	41/59
λ 毒	48.6	33	49/51
牛痘毒	190	125	37/63
细菌			
支原体	760	502	33/67
大肠杆菌	4 000	2 640	50/50
真核细胞			
酵母	13 500	8 910	37/63
果蝇	165 000	109 000	45/55
人	2.9×10^6	1.9×10^6	40/60

3.2.d 金属结合与核酸结构

核苷碱基上的金属结合部位,如图 3.17 所示,主要由内环氮原子组成。由于它们的孤电子对因共振而被很大程度地离域到环上,除非脱去质子形成亲核性非常强的RNH^-离子,鸟

① 道尔顿(dalton,Da),质量单位,等于一个氧原子质量的 1/16。1 Da≈1.65×10^{-24}g;1 g≈6×10^{23} Da——编辑注。



形　状	最　宽	中　等	最　长
增加一个碱基	2.3Å	3.4Å	3.8Å
螺旋直径	25.5Å	23.7Å	18.4Å
旋松构象	右手型	右手型	左手型
糖苷键	反式	反式	对 C,T 为反式 对 G 为顺式
每圈螺旋的碱基对数	11	10.4	12
每圈螺旋的沟深	25.3Å	35.4Å	45.6Å
每对碱基的螺旋中轴的斜度	19°	1°	9°
主槽	窄和深	宽和深	平
次槽	宽和浅	窄和深	窄和深

图 3.16　A-,B-和 Z-DNA 的结构特性及参数

苷、腺苷及胞苷环外氨基相对地与金属结合能力较弱。除非在特殊环境下,这种形式的金属络合物很少出现在中性 pH 情况下的 DNA 或 RNA 分子中。试验上和理论上的研究都显示嘌呤的 N7 位原子在核酸碱基的杂原子中是最好的亲核剂，也就是最易与金属结合的部位。

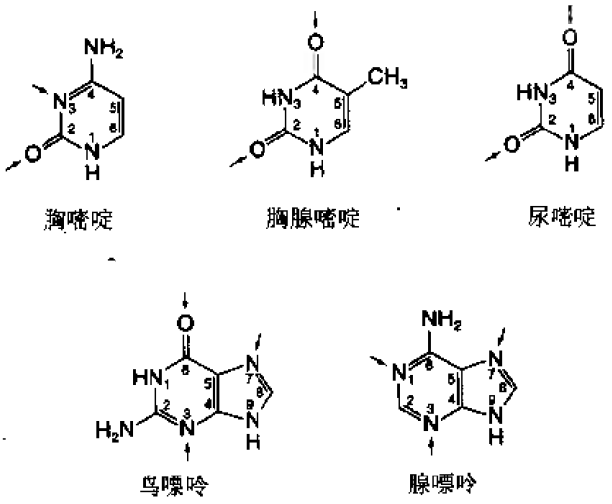
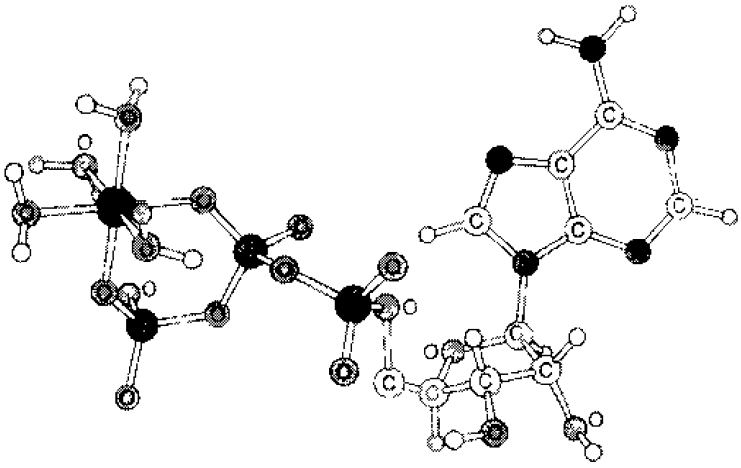
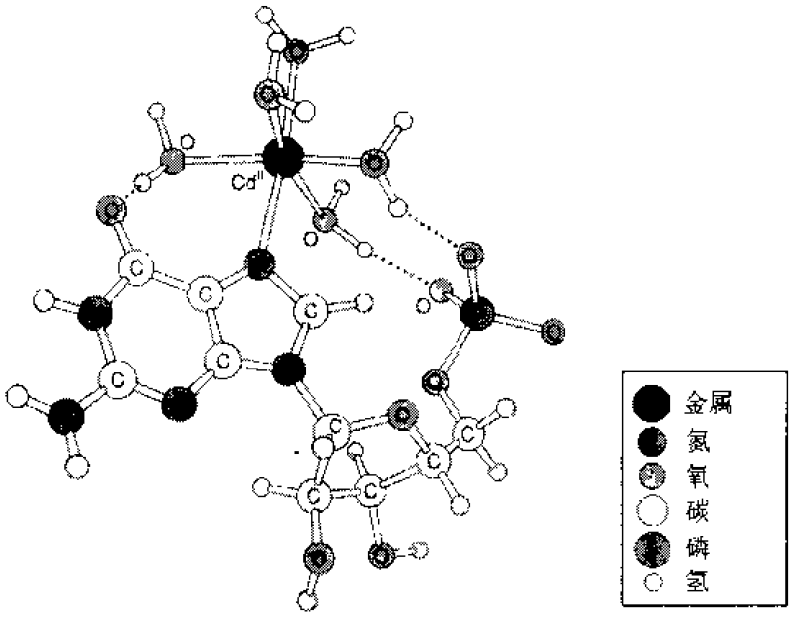


图 3.17　箭头所示为核酸碱基的金属结合部位

核苷碱基中，除了与 Cu（Ⅱ）、Cr（Ⅲ）和 Pt（Ⅱ）那样的过渡金属离子形成牢固配合物的杂原子之外，磷酸二酯键中带负电荷的氧原子也结合金属离子，特别是硬金属，如那些碱金属和碱土金属离子(Na^+，K^+，Mg^{2+})。例如在 ATP 内，α、β 和 γ-磷酯基的各种金属螯合已由 X 射线晶体学及^{31}P NMR 波谱学证明。图 3.18 描绘了已知的这样两种结构。要求 ATP 的酶也经常需要 Mg^{2+}，Mg-ATP 络合物起到底物或辅助因子的作用。估计细胞内有 90%以上的 ATP 与 Mg^{2+} 离子结合，缔合常数为 $3.8\times10^2(mol/L)^{-1}$。镁也促使 ATP 的高能磷酯键水解，并结合到形成的 ADP 上。总之，关于 Mg-ATP 和 Mg-NTP 作为底物或辅助因子在生物化学领域怎样行使功能，其详细机制还有待确立。



与β或γ-磷酸酯配位的M(ATP)
基于[Co(Ⅲ)$(NH_3)_4$(triphosphate)]的晶体结构



[Cd(II)$(OH_2)_5$ GMP]

图 3.18　两个金属-核苷酸络合物结构

镁离子紧密地结合到 tRNA 的磷酸核糖主链上，以稳定其三级结构。Pb(Ⅱ)和反式-$[Pt(NH_3)_2Cl_2]$与 tRNA 形成的络合物的特征已经晶体学确定。铅的衍生物可促进酵母 $tRNA^{Phe}$的磷酸核糖主链断裂，如图 3.15 所指出的，此图也说明了铂衍生物的结合部位。根据

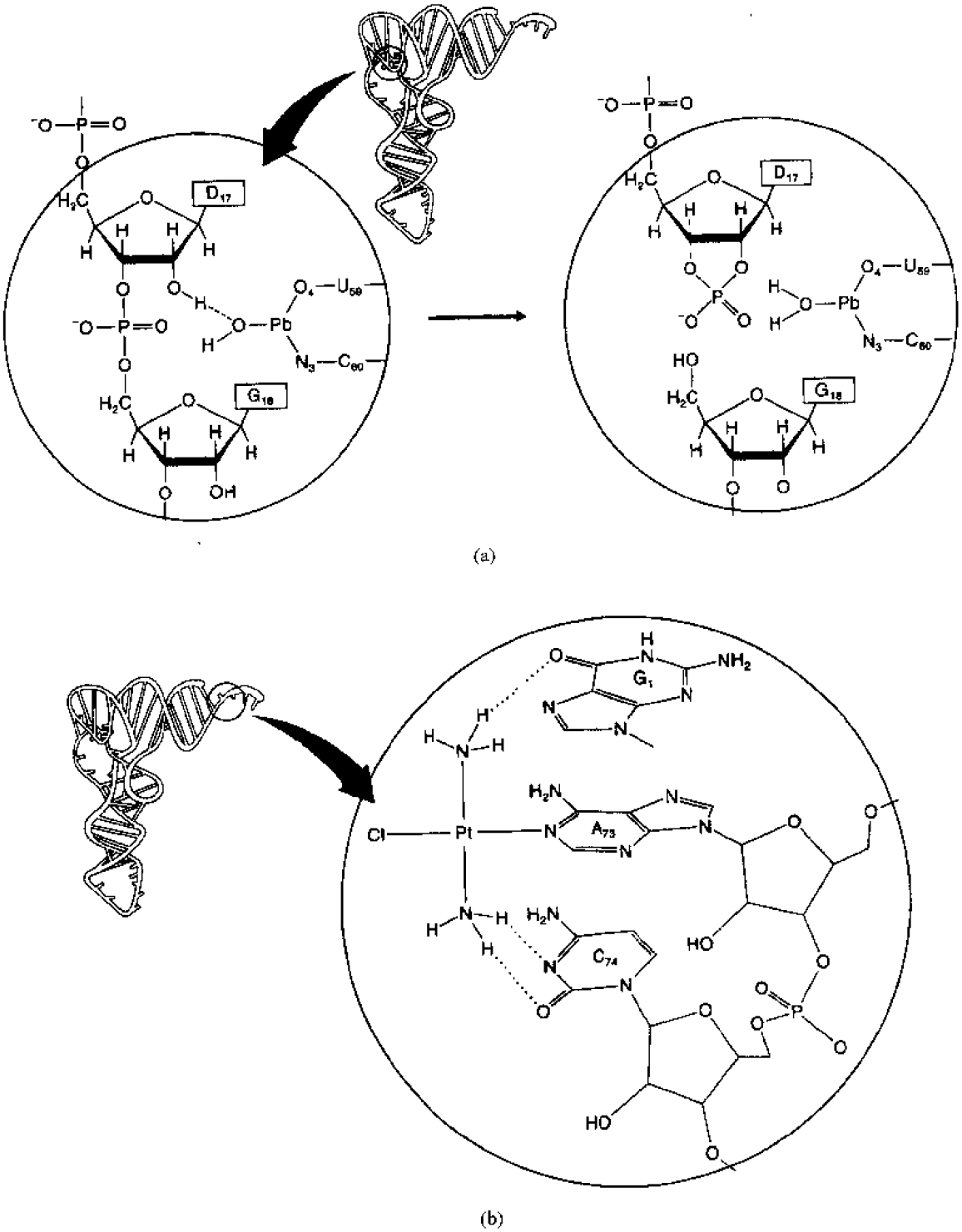


图 3.19　$tRNA^{Phe}$的两个衍生物结构

(a) Pb(Ⅱ)络合物促进 tRNA 骨架断裂，D 为二羟基尿嘧啶

(b) 源于反铂(*trans*-$[Pt(NH_3)_2Cl_2]$)的络合物

目前为止的研究报道，RNA 具有很好的金属结合能力是很显然的。金属-RNA 配合物怎样发挥生物学功能很大程度上还是没有被探究的领域，但很可能自然界利用这些成分才进化出了生物无机化学。

3.2.e 染色体的结构

在真核细胞中，DNA 被包装成染色体。当它部分地解旋时，形成染色质结构，电子显微镜下如同一串线性的小球体（图 3.20）。这些球体称为核小体，它是以 8 个组蛋白为核心，外周包绕着以 146 个 DNA 碱基对组成的 1.7 圈的浅显左手螺旋的核蛋白体络合物。彼此连接部分称为接头（linker）DNA，依照不同种属的染色质，含有 40～80 个碱基对。金属离子对其结构的稳定性是提高还是降低还不得而知。当 DNA 复制或转录时，这些结构进一步伸展，且双螺旋结构打开以化学上可辨认的核酸碱基形式将遗传信息显露。

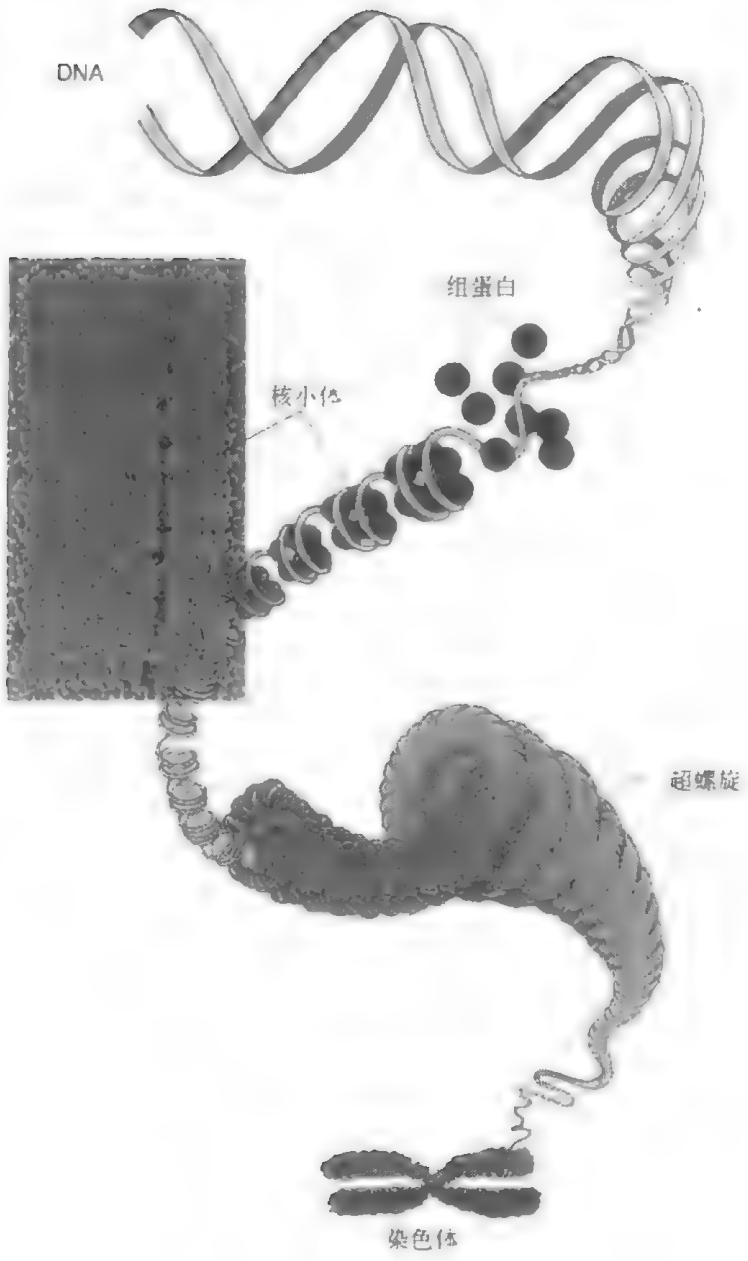


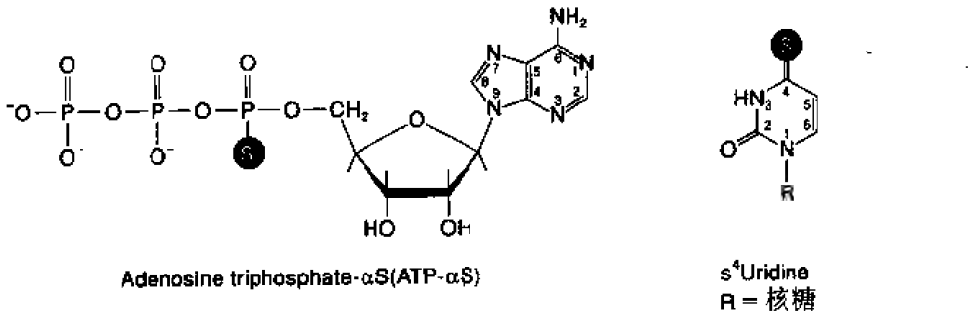
图 3.20 染色体 DNA 的超螺旋结构

3.2.f 体外的核酸合成

现代生物技术的进步已具备合成相当长的脱氧核糖核酸，直到长达 100 个碱基，以便用于特殊定点突变的研究，甚至可以是全基因的合成。此外，与产生寡核苷酸的化学相关学科也迅速发展。这些方法学上的发展影响了生物无机化学，同时也为制备具有独特金属结合性质的寡核苷酸提供了机会。在体内一些特殊部位被修饰了的 DNA 已被插入全长基因组并进行研究。在合成的 DNA 片段中对金属结合的特异性可以经过各种策略而得到，例如下面描述的那样，可应用巯基核苷或硫代磷酸酯化(phosphorothioate)的化学方法引入硫原子，或应用特定的脱氧核糖核酸序列如 d(GpG)，它可形成顺铂氨离子(cis-$\{Pt(NH_3)_2\}^{2+}$)的内链交联。这样，特定位点诱变(site-specific mutagenesis)在对金属蛋白化学中有关生物无机化学问题的应用与金属/核酸化学具有同等重要性，两者又都被分子生物学技术上的进步所促进。

3.2.g 核酸分子中的硫原子

除了如图 3.12 所示的五种标准碱基之外，几种被修饰的核苷已经被发现，尤其在 RNA 分子中，其中对于生物无机化学很有趣的一例是 4-巯基脲嘧啶(4-thiouridine，s^4U)，其结构在图 3.21 已给出。作为自然界存在的转移 RNA 分子成分被发现，4-巯基脲嘧啶(s^4U)的硫原子



Adenosine triphosphate-αS(ATP-αS)

s^4Uridine
R = 核糖

图 3.21 两个含硫的核酸成分

已显现出是合适的金属结合部位，特别对那些软金属离子，如同 Hg(Ⅱ) 或 Pt(Ⅱ)，这种结合的特异性几乎是绝对的，因为还没有其他 DNA 或 RNA 的供体原子能与软金属中心以这么高的亲和性络合。类似的亲和性可通过用硫代核苷酸酯掺入 DNA 或 RNA 的方法来获得。这种核苷酸，例如 ATP-αS，它们可以被许多酶所接受以替代正常与其相对应的核苷酸。因此，就可以合成在核苷酸 5′-位上含有硫原子的 DNA 或 RNA 分子，也就给软金属提供了选择性很强的结合部位。这种化学性质已被用来探测核酸结构，即通过应用高电子密度对重金属进行 X 射线衍射和电子显微镜方面的研究，或用顺磁性金属离子进行磁共振方面的研究。这种手段在解决生物无机化学问题方面很有前景。

3.3 结合金属的其他生物分子

3.3.a 辅基

许多金属蛋白除蛋白本身外还含有一些有机成分，这些成分常常指的就是辅基(prosthetic group)，其中也含有某些结合的金属离子。辅基包括原卟啉Ⅸ(protoporphyrin Ⅸ，图 1.2)。作为金属络合物，它通常指的是亚铁血红素。另一类重要的辅基构成是叶绿素，如图 3.22 所

示，它是作为光合作用基本因素的镁络合物。最后，如图 1.3 所示的喋呤环系统，即叶酸的组分之一，也是目前普遍关注的课题，因为一种喋呤衍生物已被暗示为所谓钼协同因子（molyb denum cofactor，Mo-co）中的钼结合元件（unit）。这种类型的元件对于含钼的酶来说好像很普遍，而固氮酶则例外。

有关这些元件的进一步探讨，可见于第 5 章。

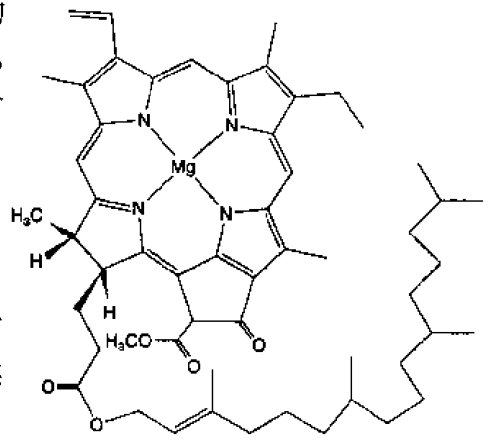


图 3.22　叶绿素分子的化学结构

3.3.b　辅酶 B_{12}

辅酶（coenzyme B_{12}）是低分子量的非蛋白分子，它如同底物一样参与酶促催化反应。了解最多的金属辅酶要属钴维生素（cobalamin）亦即维生素 B_{12}，顾名思义，它含有钴。此维生素作为氰化物加合物被获得，亦即图 1.6 所示的氰钴维生素（cyanocobalamin）。它是在 FAD 参与的双电子反应中被还原而形成的 Co（Ⅰ）络合物。这个强有力的亲核试剂（nucleophile）与 ATP 反应引发出腺苷酸化的 B_{12} 辅酶。这一辅酶中的钴-碳键经过均裂（homolytic cleavage）形成的自由基被认为参与了一些酶催化的质子转移反应。甲基钴维生素（methylcobalamin）也可以将甲基离子（CH_3^-）转移给水溶液中的汞（Hg）、铅（Pb）和锡（Sn）盐，生物的甲基化反应可能导致这些元素的毒性。

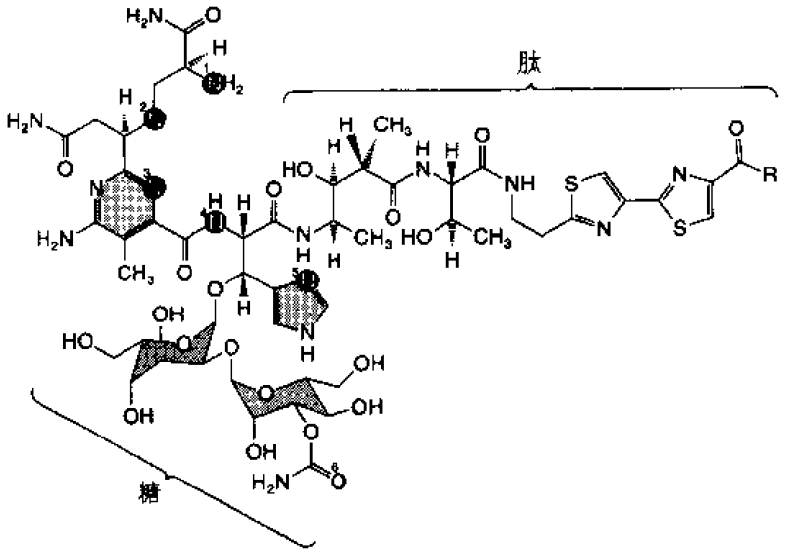
3.3.c　博莱霉素和铁载体

博莱霉素（Bleomycin）是从链霉属真菌（fungus streptomyces）中提取的抗肿瘤抗生素。它的结构如图 3.23 所示。博莱霉素结合到 DNA 上，并且利用氧的氧化还原化学性质与它的金属结合多肽部分缔和，从而催化糖磷酯主链的裂解。由于博莱霉素的糖蛋白特性，金属配位能力，和可结合与裂解 DNA 的反应，它便是生物无机化学的珍奇之物。

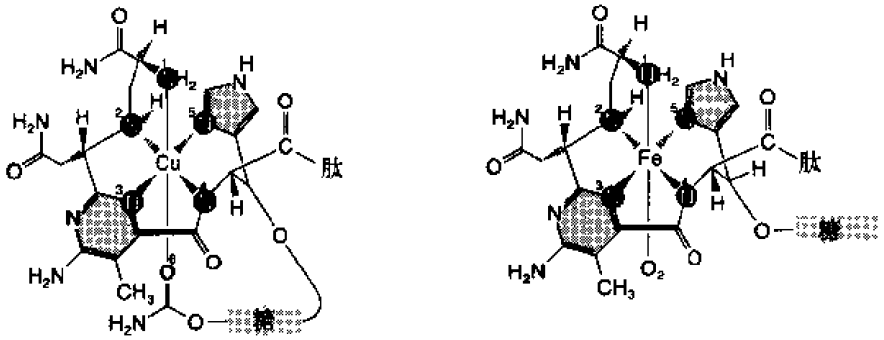
铁载体由微生物分泌到环境中去以促进铁摄入的小分子。它们的功能是通过以高亲和性与铁离子结合，产生可溶性的能被这些微生物摄取的络合物来体现。其示例包括环状三酯肠杆菌素（cyclic triester enterobactin）和线性分子脱铁草酰胺（desferroxamine）。见图 3.24。关于铁载体，本书将在 5.1 节进行更详尽的讨论。

3.3.d　复杂的组装

许多有趣的金属结合组装（complex assemblies）源于含有几种生物大分子的络合物。这些生物大分子的组装必然较比本章前而了解到的其结构来得复杂，所以我们只具备了有关它们配位性质的很初级的知识。细胞膜、病毒和细胞内间隔，像核糖体、线粒体及内质网都可作为这类组装的例子。重要的生物无机成分，经常是被包被（embeded）在膜结构中，比如包含于电子传输步骤和供呼吸所需的氧化磷酸化反应的一系列细胞色素就是如此。另一个关键的例子是发现在细菌和植物膜中的光合作用的反应中心。关于神经学上和细胞内触发反应中一个至关重要的现象，穿过膜的金属离子的转运过程也就更可作为对复杂生物结构的认识、影响生物无机化学的范例。

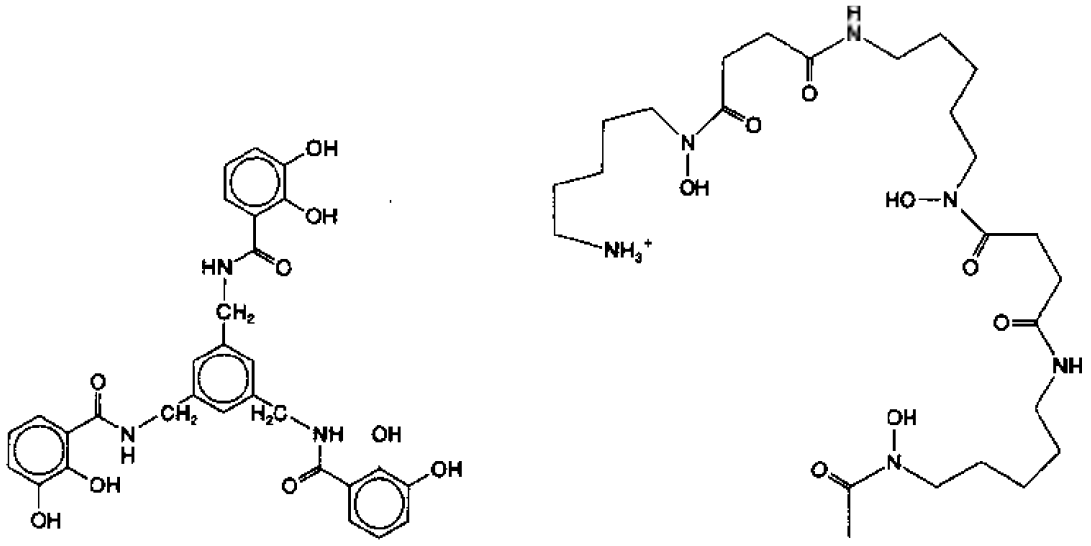


(a)



(b) (c)

图 3.23　博莱霉素(a)及其与金属离子络合物的推测结构(b,c)



(a) (b)

图 3.24　铁载体肠杆菌素(a)与脱铁草酰胺(b)的化学结构图

习　题

1. 胺和乙二胺在无机化学中是常见的配体；然而赖氨酸侧链 ε-氨基则极少与蛋白质中的金属配位。请解释为什么赖氨酸的 ε-氨基在水溶液中很难充当金属蛋白的配体。
2. 转录因子 ⅡA，一种刺激基因转录的蛋白，被认为可与相同序列的 DNA 或 RNA 双链结合。这一认识仍存在争议。试解释一个蛋白与两种双链核酸结合的主要阻碍是什么。
3. 假设一个蛋白主链周围的基团以自由旋转的单键与其相连，并通常以 3 个旋转构象存在的话，试算出 100 个氨基酸构成的蛋白质含多少个这种构象。同样条件下，100 个核酸的情况将如何？评估你的计算值的数量级。
4. 画出由一对六肽所构成的反平行 β-折片的结构（NH_2-A-L-D-V-S-F-COOH，NH_2-K-T-N-C-R-Y-COOH）。
5. 给出下面序列相应氨基酸的单字母符号，并标示出可能与软过渡金属离子结合的三个残基：
   His-Glu-Leu-Pro-Met-Glu-Ile-Met-Thr-Arg-Ala-Pro-Pro-Glu-Asp-Ile-Asn-Ala-Gly-Glu-Asn-Glu。

参 考 文 献

蛋白质结构

C. Branden and J. Tooze. 1991. *Introduction to Protein Structure*. Garland, New York.
T. E Creighton. 1993. *Proteins: Structure and Molecular Properties*, 2nd ed. W. H. Freeman, New York.
G. E. Shultz and R. H. Schirmer. 1979. *Principles of Protein Structure*. Springer-Verlag, New York.

核酸结构

R. L. P. Adams, J. T. Knowler, and D. P. Leader. 1986. *The Biochemistry of Nucleic Acids* 10th ed. Chapman and Hall, London.
D. Freifelder, ed. 1978. *The DNA Molecule: Structure and Properties*. W. H. Freeman, San Francisco.
W. Saenger. 1988. *Principles of Nucleic Acid Structure*, 2nd corrected printing. Springer-Verlag, New York.

分子和细胞生物学

B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Ruff, K. Roberts, and J. D. Watson. 1989. *Molecular Biology of the Cell*. Garland, New York.
B. Lewin. 1990. *Genes IV*. Oxford University Press, Oxford.
L. Stryer. 1988. *Biochemistry*, 3rd ed. W. H. Freeman, New York.

酶

A. Fersht. 1985. *Enzyme Structure and Mechanism*, 2nd ed. W. H. Freeman, New York.
W. P. Jencks. 1969. *Catalysis and Chemistry in Enzymology*. McGraw-Hill, New York.
C. Walsh. 1979. *Enzymatic Reaction Mechanisms*. W. H. Freeman, San Francisco.

辅基

S. P. Cramer and E. I. Stiefel. 1985. "Chemistry and Biology of the Molybdenum Cofactor," in T. G. Spiro, ed., *Molybdenum Enzymes*. Wiley, New York, 411–442.
J. Dabrowiak. 1982. "Bleomycin." *Adv. Inorg. Biochem.* 4, 69–113.
D. Dolphin. 1982. B_{12}, Volumes 1 and 2. Wiley, New York.

A. B. P. Lever and H. B. Gray. 1983. *Iron Porphyrins*, Volumes 1–3. Addison Wesley, New York.

K. N. Raymond. 1984. "Complexation of Iron by Siderophores: A Review of their Solution and Structural Chemistry and Biological Function." *Top. Curr. Chem.* 123, 49–102.

第 4 章　生物无机化学研究中的物理方法

4.1　时标评述
4.2　X 射线方法
4.3　磁共振方法
4.4　穆斯鲍尔(Mössbauer)谱
4.5　电子光谱和振动光谱
4.6　磁性测量
4.7　还原电位测定
4.8　电子显微探针分析

为了在实验科学上取得进步，必须用恰当的方法来研究我们感兴趣的某些问题。本章的目的是对目前生物无机化学家常用的物理方法全貌作一综述。我们并不想教会读者懂得每一种技术的原理，因为详细资料可从有关的教科书得到。这里着重要讨论的是各种物理方法如何影响生物无机化学的发展，以及生物无机化学有时又如何促进物理方法的改进，这的确是很有意思的。

本章要讨论的是，在分子结构测定和电子结构表征方面，所应用的特定物理方法的优点和局限性。金属离子可作为一类生物功能基团，它们的电子性质和高电子密度使其特别适合用物理技术来研究，比如 EXAFS、穆斯鲍尔(Mössbauer)谱、共振拉曼(Raman)谱、电子顺磁共振谱等。生物有机化学家则很少使用这些方法。

4.1　时 标 评 述

为了理解生物体中过渡金属中心的性质，掌握它们电子能态和磁性的知识是很有用的。这些性质经常与金属中心的配位能力和分子几何构型相关联，此二者都对在这些配位位置上的反应有影响。而且，电子和磁学现象是大部分波谱技术的基础，波谱技术可用来监控生物中金属位置的化学反应性。各种形式波谱的共同之处都是用给定频率或频率范围的光辐照样品。光可被散射或被吸收，其强度明显变化是这些物理方法的基础。与光的波长相关联的光的频率可用来估算时标(time scales)，化学现象能够借助时标，用给定的波谱方法来探测。表 4.1 总结了常用于研究生物无机化学的方法。

用来探测化学反应和反应速率与光的频率之间的关系可用一个简单类比来理解。设想用照相机来摄制一动态画面，相机的快门每秒开关 40 次。用这相机来拍摄一带有刹车柄的火车。如果车轮转得很慢，则动态的照片会提供单个刹车柄的圆周运动的准确圈数。当车轮转动得越来越快时，从照片中看到刹车柄运动逐渐变慢，进而完全不动，接着倒退行走，最终是模糊的刹车柄。有些读者可能在商业照片中看到过这一现象。车轮转动的速率和化学反应的速率类似，快门开关的速率和表 4.1 中列出的时标类似。为了进行精确的动力学研究，必须选择适当的技术。例如，通常研究电子转移反应比研究原子转移的化学反应要求更快的方法。电子光谱就是

表 4.1 通常用于光谱分析技术的时标

技　术	时　间
电子衍射	$\approx 10^{-20}$s
中子衍射	$\approx 10^{-18}$s
X 射线衍射	$\approx 10^{-18}$s
UV 光谱	$\approx 10^{-15}$s
可见光谱	$\approx 10^{-14}$s
红外光谱	$\approx 10^{-13}$s
EPR 谱	$\approx 10^{-4} \sim 10^{-8}$s
NMR 谱	$\approx 10^{-1} \sim 10^{-9}$s
NQR 谱	$\approx 10^{-1} \sim 10^{-8}$s
穆斯鲍尔谱	$\approx 10^{-7}$s
分子束光谱	$\approx 10^{-6}$s
实验分离异构体	$>10^{2}$s

一快速方法。波长 $\lambda=500$ nm、频率为 $(\nu=c/\lambda) \approx 3\times10^{15}\ s^{-1}$的光，可以分辨出飞秒时标范围的化学变化。另一方面，^{1}H NMR 谱分辨动力学现象的能力，与质子在不同化学环境中的共振频率差有关，而这是一个慢得多的方法。这一技术典型的时标是在毫秒(ms)数量级。

4.2 X 射线方法

X 射线的波长是 1 Å 量级，这和原子间距的大小处于同一个量级。因此 X 射线对测定分子结构非常有用。目前广泛使用的两种根本不同的 X 射线法分别是衍射和吸收。

4.2.a X 射线衍射

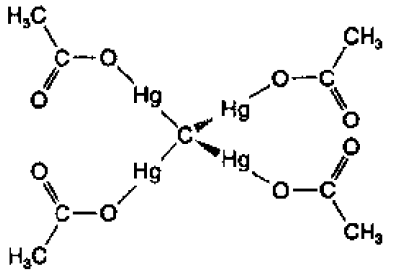
衍射过程与是否能获得平移有序的样品有关，即能否得到单晶。当有适当的晶体时，X 射线晶体学是研究大分子结构、金属配位几何构型最有力的结构探针。经常测得的小分子结构的键长有 0.01～0.001 Å 量级的不确定性。大分子结构通常比小分子无机配合物测定的准确性小一个量级。蛋白质晶体对 X 射线的衍射作用不如小分子晶体好，主要是因为蛋白质晶体中水的含量高，经常高达 50%左右，它们通常有很高的无序度。4.1 式给出 Bragg 定律：

$$d=\frac{\lambda}{2\sin\theta}=\frac{1.5418\ \text{Å}}{2\sin\theta}\quad\text{(铜靶辐射)} \tag{4.1}$$

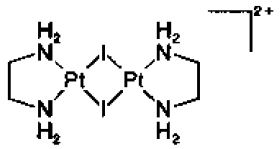
其中 θ 是入射和衍射的 X 射线束之间散射角的 1/2。由于分辨率的局限性，最好的情况分辨率略小于 2 Å，大部分的配位化合物则小于 1 Å。从单晶 X 射线照片中，很容易由距离中心最远的点(最大的 θ 值)估算出分辨率，由于分辨率的限制，很难分辨出单个的原子。因此，对于金属蛋白，为了确认某一特定氨基酸残基的电子密度，通常必须知道氨基酸的序列。这样的要求使得这一方法的工作量很大，而且对于重原子衍生物，还需要通过上千次反射测量出相角，并从这些反射得到出衍射图(同晶取代技术)。从第一次得到金属蛋白单晶的 X 射线衍射图，直到最后测定出分子的精细结构，这一过程常常要经过几个月或者几年。当然，由于数据采集和结构精修方法的进步，这样漫长的时间过程正在缩短。这些进步包括能快速测量衍射图的面探测器的发展，以及可探测较小晶体的同步辐射的应用。虽然适于衍射用的核酸的单晶还较难得到，但 X 射线衍射也能用来测定其结构。尽管存在这些问题，但对于在金属与核酸结合的有限

范围内，很值得努力去得到最终的结果，而且目前已经能够给出金属蛋白最精确的结构信息。

一般用于大分子结构测定的衍射方法中包含生物无机组分。通常把大分子晶体浸泡在重金属配合物的溶液中，来制备具有电子密集原子或基团的衍生物。常用的标准试剂中含有单一的重原子，诸如铂、汞或者金。当生物分子的尺寸增大以及复杂性增加时，就要求有足够量高电子密度的重原子衍生物，以便为同晶取代技术提供足够的物相。例如，四(乙酰汞基)甲烷(TAMM)和二-μ-碘二(乙二胺)合铂(Ⅱ)(PIP)(见图 4.1)可用来解析核小体的核心微粒结构，这是 DNA 的 8 个多肽链和 146 对碱基组成的复杂化合物(见 3.2.e 节)。



(a) 四(乙酰汞基)甲烷，TAMM



(b) 二-μ-碘二(乙二胺)合铂(Ⅱ)，PIP

图 4.1 两个高密度电子的配合物结构

它们用于制备 X 射线结晶学研究需要的大分子的重原子衍生物

图 4.2 是部分电子密度图和推导出的模型化合物。这些稳定的、水溶性的商业化试剂含有一系列多种重金属原子，属那些正在发展的无机配合物，可供晶体学家研究大分子组装。X 射线衍射技术也用来研究 DNA 的多晶纤维。这样的数据对发现 DNA 的双螺旋有很大的意义。已经证明了电子密集金属试剂对这一类型的某些研究是很有价值的。像溴菲啶鎓(ethidium bromide)这样的有机稠杂环化合物，能嵌入到 DNA 双螺旋内，并与之结合，相间占据碱基对之间的空位达饱和(图 4.3)。这一"相邻排斥"结合模型的直接证据由多晶 DNA 纤维的 X 射线衍射图给出，其中含有嵌入的[Pt(terpy)(HET)]。含铂样品在嵌入结构中，沿螺旋轴近邻的 Pt-Pt 间的重复距离对应 X 射线衍射图，清楚表明嵌入体间距沿经线为 10.2 Å 的反射，而嵌入菲啶鎓的 DNA 纤维的 X 射线研究，得出仅为 3.4 Å 的经线反射，因为纯有机嵌入体的散射能力使其难以同核苷酸碱基对区别。

一旦一组原子的坐标由 X 射线衍射法得到，通常把它们储存在便于使用的数据库中，例如 Brookhaven 的蛋白质数据库。从这些原子坐标数据可得到计算机模拟图形和其他模型化合物，以及一系列键长和键角。

表 4.2 总结了一些可提供 X 射线结构分析的金属蛋白。

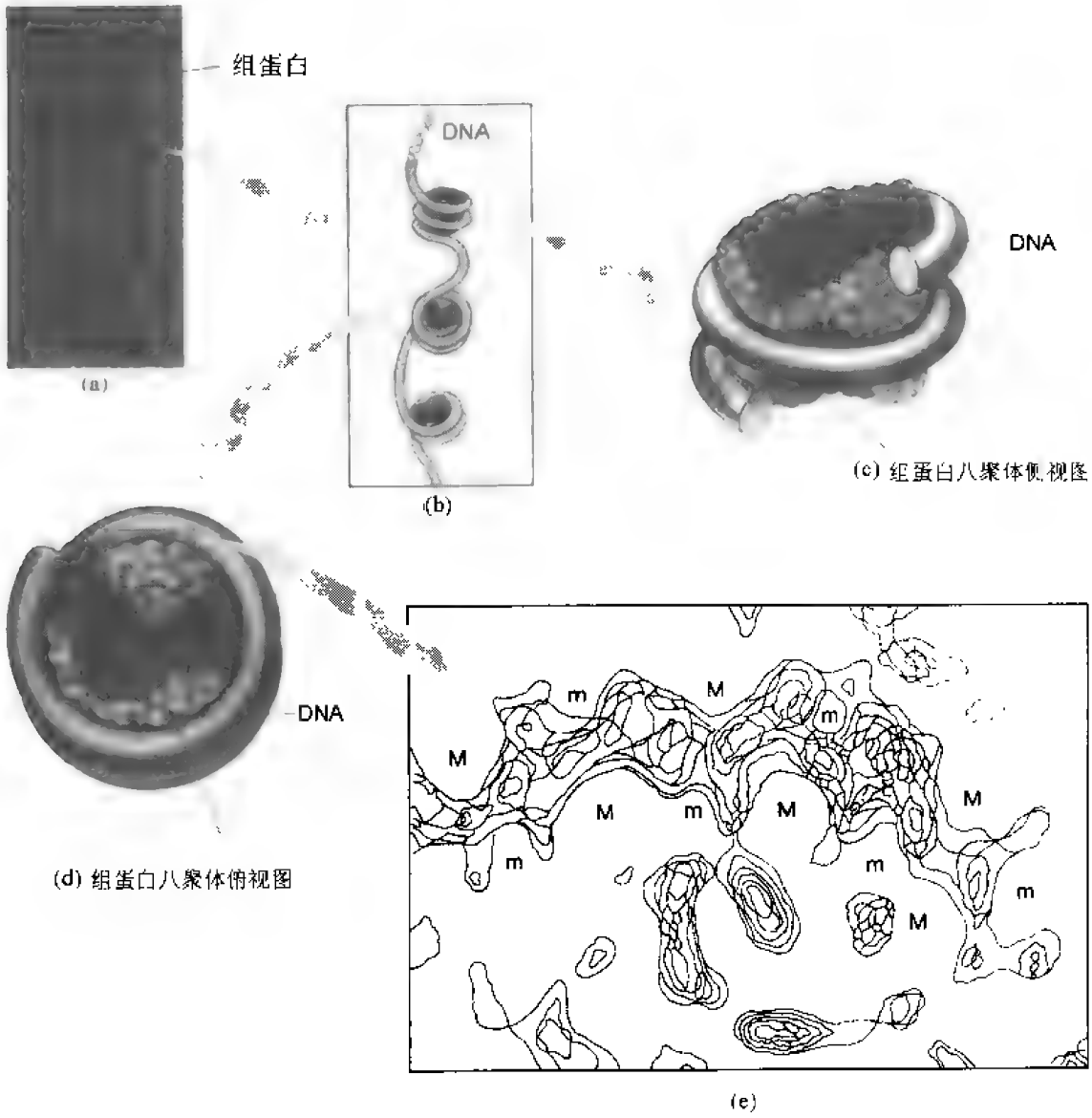


图 4.2　核小体核心粒子结构

(a) 核小体的电子显微图；(b) 核小体与DNA 连接体示意图；(c) 核小体粒子侧视图以及 DNA 包围的组蛋白八聚体；(d) 核小体核心粒子的俯视图；(e) 部分电子密度图 及DNA的大槽(M)和小槽(m)，产生电子密度图的物相由图4.1的配合物提供

[其中(e)改编自 T. J. Richmond et al. , *Nature* 311,532～537(1998)]

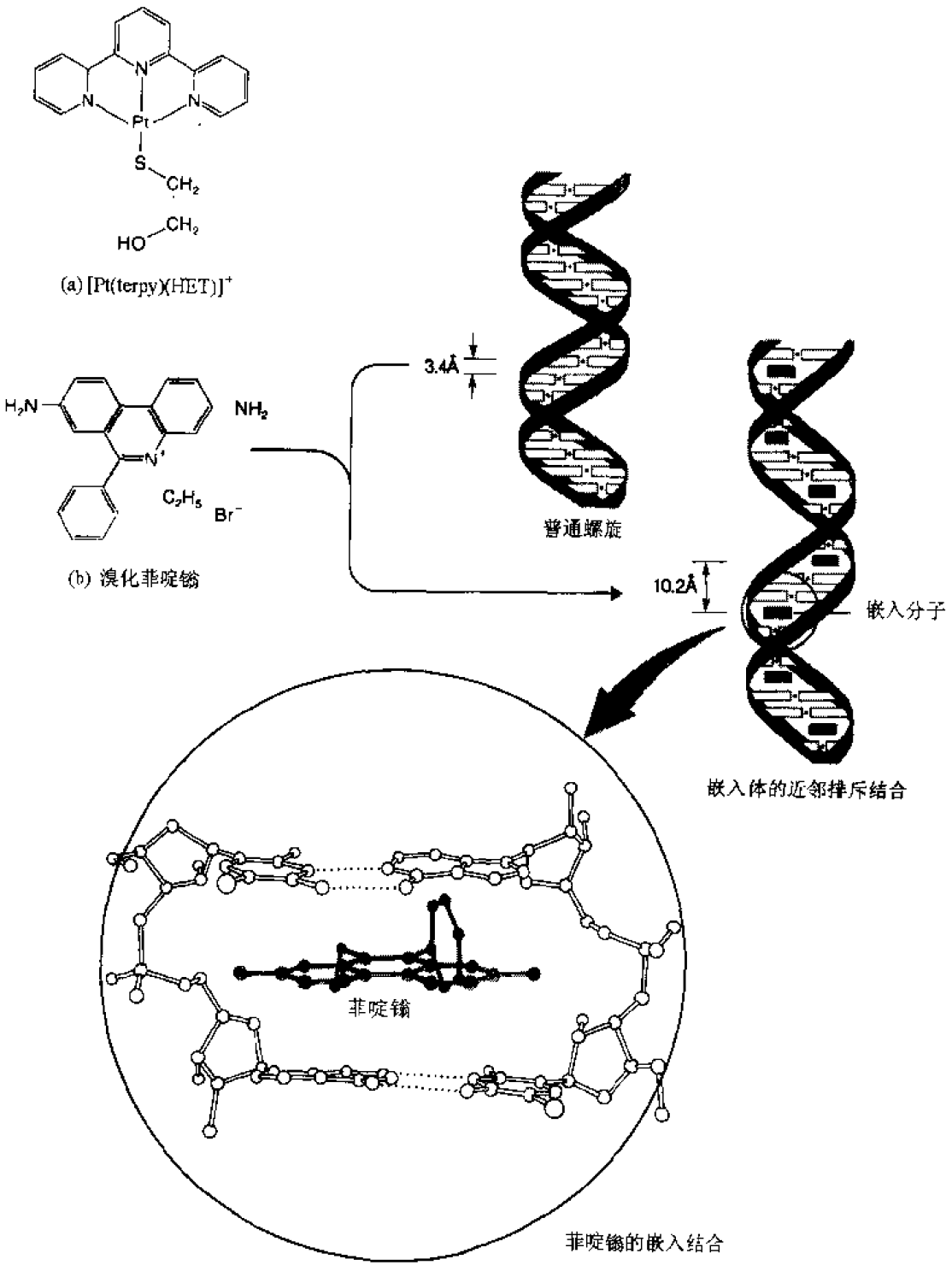


图 4.3　嵌入方式连接的 DNA 图

(a) 金属嵌入化合物[Pt(terpy)(HEY)]+的结构;(b) 有机嵌入体菲啶锑的结构[嵌入体和DNA的结合,证明了近邻排斥原理。达到饱和时,仅占据间隔的可占据部位,最终的嵌入体具有 10.2 Å的间距(图中也给出了嵌入到 DNA 中的菲啶锑分子的近视图)]

表 4.2　可提供晶体学数据的金属蛋白[a]

蛋白质	金　属
抗坏血酸氧化酶(ascorbate oxidase)	铜
可可碱乙酸钠(azurin)	
细胞色素 *c*(cytochrome *c*)	
细胞色素 P-450(cytochrome P-450)	铁
铁氧还蛋白(ferredoxin)	铁
铁蛋白(ferritin)	铁
半乳糖氧化酶(galactose oxidase)	铜
蚯蚓血红蛋白(hemerythrin)	铁
血蓝蛋白(hemocyanin)	铜
血红蛋白(hemoglobin)	铁
胰岛素(insulin)	锌
铁传递蛋白(lactoferrin)	铁
肝乙醇脱氢酶(liver alcohol dehycrogenase)	锌
金属硫蛋白(metallothionein)	镉/锌
肌红蛋白(myoglobin)	铁
亚硝酸盐还原酶(nitrite reductase)	铜
固氮酶(nitrogenase)	铁、钼
光系统 I 还原中心(photosystem I reaction center)	镁、铁
质体蓝素(plastocyanin)	铜
原儿茶酚 3,4-双加氧酶[b](protocatechuate 3,4-deoxygenase)	铁
核苷酸还原酶(ribonucleotide reductase)	铁
红氧还蛋白(rubredoxin)	铁
超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)	锰,铁或铜/锌

[a] 有关金属蛋白更全面的情况，见 T. Creighton，1993. *Proteins: Structure and Molecular Properties*. 2nd ed. W.H. Freeman, New York.

[b] 原文 de 应为 di，即双加氧酶，而非“脱氧”——译者注。

4.2.b　X 射线吸收光谱(XAS)

X 射线被吸收后，能激发元素 1s(K 吸收边)或 2s、2p(L 吸收边)的电子到空的定域轨道，对能量更高的 X 光子还能激发出连续光谱。这一现象已经发现了几十年，但只有随着同步辐射技术的进步，从其中可得到高强度和可调谐的 X 射线束，X 射线吸收才得到了很好的应用。在此之前，常规方法得到的 X 射线因为强度太弱，对所有样品(强度最大的除外)都不能产生明显的 X 射线吸收信号。通过检测 X 射线吸收边(即吸收起始点)的能量，可确定待测金属离子的氧化态。通过电子从内层跃迁到价层，在有利条件下，可获得电子结构信息。相邻原子通过背散射对 X 射线吸收能量谱的调制，能获得广延 X 射线吸收精细结构(EXAFS)，从中可得出金属配位几何构型的细节。这一方法广泛用于金属蛋白的结构研究，一个突出的优点是可研究非晶固体，甚至溶液。对小分子配合物用 EXAFS 和单晶 X 射线衍射两种方法研究比较可看出，对模型结构，拟合 EXAFS 数据得到的几何结构信息的可靠性达±0.01 Å。

最早应用 EXAFS 谱获得成功的是属于铁-硫蛋白的红氧还蛋白，这使 EXAFS 在生物无机化学界获得了很好的信义。红氧还蛋白的实验 EXAFS 谱和用 Fe—S 单键拟合得到的谱图

示于图 4.4。数据分析证明，其中 4 个 Fe－S(半胱氨酸)距离都相等，误差在±0.02 Å 内。这和早先的单晶 X 射线衍射结果矛盾，那时认为其中一个 Fe－S 短键明显比其他 3 个长键的键长平均值短≈0.25 Å。后来对单晶 X 射线衍射数据的精修，给出了更加对称的结构，结果和 EXAFS研究相符。

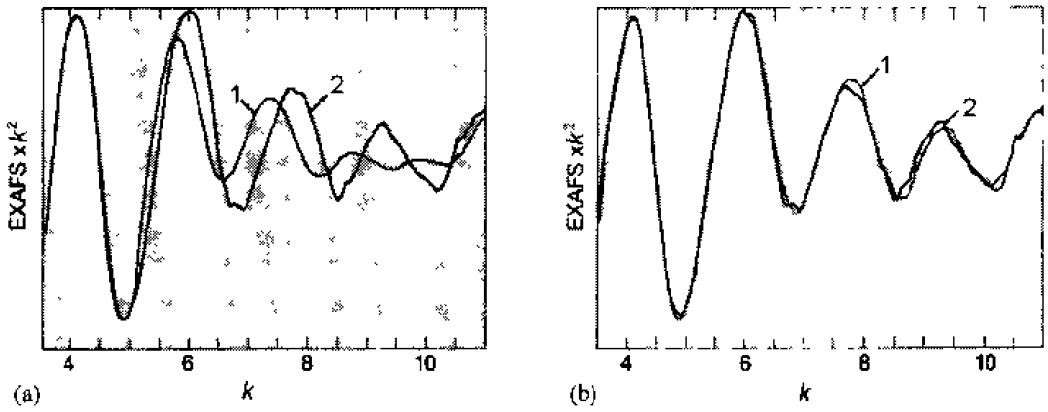


图 4.4　铁蛋白中的红氧还蛋白的广延 X 射线吸收精细结构谱(EXAFS)

(a) 实验光谱(曲线 1)和用初始结晶学坐标计算的光谱(曲线 2)；(b) 实验光谱(曲线 1)和计算光谱(曲线 2)的对比，计算中假设铁-硫距离相等 [引自 R. G. Shulman 等，*Proceedings of the National Academy of Sciences* USA 72，4003～4007(1975)]

金属生物高聚物的 EXAFS 测试结果，往往于对称位置最精确，即第一配位层内相对重的元素(Z＞14)的金属离子所处的位置。就此而言，红氧还蛋白$[Fe(SR)_4]^-$的情况几乎是最理想的。对于在第一配位层内，有不同类型原子、不同原子间距的对称性差的位置，就很难拟合出准确无疑的结构模型。与定义明确的模型化合物比较，对于这一研究过程很有帮助。通常用来减少原子热运动的低温操作(达 4.2 K)，要求冷冻溶液或冷冻干燥的粉末。这些条件有时可能会改变蛋白质活性部位的结构，因此必须在控制实验中检测。最理想的情况是进行控制实验来确定以下情况，即在 EXAFS 实验中，当把准备研究的生物样品置于高强度 X 辐照下，样品的结构、生物活性或化学性质都不改变。EXAFS 实验完成后，再测试酶样品在溶液中的活性，这是确认在实验过程中生物样品是否保持生命力的一个方法。

4.3　磁共振方法

当把具有磁矩的微粒放置在磁场中时，就所用的磁场而言，在不同方向上磁矩的取向能态具有不同的能量。吸收适当频率的光可诱导出能态间的跃迁，这一现象称为磁共振。如果微粒是电子，采用容易到达的磁场强度，适宜的频率在微波区域，这一方法称为电子顺磁共振。如果微粒是原子核，合适的频率在射频区域，这一方法称为核磁共振。

4.3.a　电子顺磁共振谱(EPR)

这一方法要求样品具有未成对电子，它对研究各种金属蛋白是很理想的，其中包括 Cu(Ⅱ)，Co(Ⅱ)，Fe(Ⅰ)，Fe(Ⅱ)，Mn(Ⅱ)，Mn(Ⅲ)，Mo(Ⅴ)，以及$\{Fe_2O\}^{3+}$和$\{Fe_4S_4\}^{+,3+}$金属原子簇。这一方法非常灵敏，能检测浓度低达 μmol/L 范围的高自旋铁离子。有意思的是，EPR 谱可用于诸如铁氧还蛋白等含铁蛋白的分离和纯化过程。因为电子传递蛋

白没有可测量的催化活性，它们的纯度不能用检测酶活性的经典生物化学方法来确定。然而，普通的色谱柱方法的提纯步骤可由 EPR 的谱图形状和信号的积分强度来监控。

EPR 谱对确定电子结构，以及电子结构对配位层组成和构型的相关性很有价值，对此可由 EPR 谱在铜的生物无机化学的某些应用来说明。铜(Ⅰ)特别适合于用 EPR 研究，因为它只有一个未成对电子。同时，由于电子-核-自旋之间的超精细相互作用(用参数 A 代表)，^{63}Cu和^{65}Cu 核(核自旋 $I=3/2$)产生特征的四线谱图。此外，电子在室温下，自旋弛豫时间足够长，因此光谱能在流动的溶液中观察到。后一性质可在适合于生理条件的温度下监控生物样品。而且，常常用冷冻溶液 EPR 谱的研究来阻止分子的翻滚运动，而分子的热运动会使 g 因子的各相异性平均化。对通常具有四方形几何构型的铜(Ⅱ)中心，g 因子通常是轴向对称的，具有 $g_{zz}>g_{xx}=g_{yy}>2.0023$，2.0023是自由电子的 g 值，这里的 z 轴垂直于铜和 4 个配体组成的平

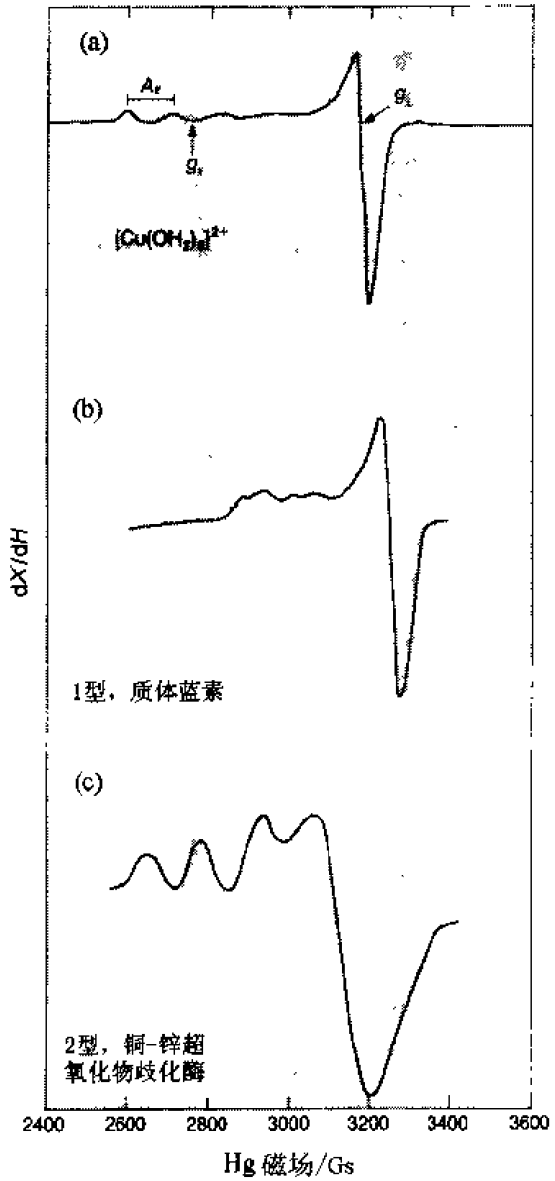


图 4.5　典型的 Cu(Ⅱ)配合物的 EPR 谱

(a) $[Cu(OH_2)_6]^{2+}$；　(b) 质体蓝素中的 1 型铜部位以及(c) 铜-锌超氧化物歧化酶中的 2 型铜部位

[图中横坐标单位 Gs(高斯)为非许用单位，$1Gs=10^{-4}T=10^{-4}Wb/m^2$—— 编辑注]

面。另外，平行和垂直于分子对称轴的组分（分别用 $A_{\parallel}$ 和 $A_{\perp}$ 表示）表明了超精细相互作用的各相异性。典型的Cu(Ⅱ)配合物 $Cu(H_2O)_6^{2+}$ 的 EPR 谱示于图 4.5，铜蛋白质体蓝素以及超氧化物歧化酶的谱图也同时给出。

生物体中存在的铜，至少有三种在光谱上明显不同的类型，分别用 1，2 和 3 型示于图 4.5 中（译者注：图中只给出 1，2 型）。从这些铜中心的 EPR 谱中得到的 g 值和超精细分裂参数列于表 4.3 中，其他生物无机化学中重要的、种类繁多的顺磁过渡金属离子的相关数据也一并列入表中。质体蓝素的 EPR 信号是 1 型铜信号的例证（图 4.5），它对于铜中心具有特别小的 $A_{\parallel}$ 值，表明了金属未成对电子密度明显的离域化。这一结果以及一个很强的[$\varepsilon \approx 3000(mol/L)^{-1} \cdot cm^{-1}$]的红色（译者注：原文为蓝色）（$\lambda \approx 625$ nm）吸收带，用来在质体蓝素与一些与铜相关的氧化还原蛋白和加氧酶蛋白中确定 1 型铜中心的存在。对质体蓝素的 X 射线结构分析说明，存在着一个高度畸变的铜配位环境，其中包含两个几乎平卧在金属平面上的组氨酸氮和一个半胱氨酸硫醇中的给电子体硫，以及一个和甲硫氨酸残基的硫醚单元结合的、平面外的轴向 Cu　S 键。图 4.5 中给出的Cu-Zn超氧化物歧化酶是在生物无机化学中发现的第二类型铜（Ⅱ）的 EPR 信号，它们具有对大多数铜配合物特征的 g 值和 A 值。第三类型的铜则由于两个 Cu(Ⅱ)中心的反铁磁交换偶合（见下述）和（或者）快速的电子自旋弛豫，因此没有 EPR 信号。像漆酶（elucidation）和抗坏血酸氧化酶（ascorbate oxidase）这样的蛋白质含有所有三种类型的铜，用 EPR 谱和光学光谱来解释这样复杂的情况，可认为是生物无机化学在结构层次研究上的一个重大胜利。近年来，抗坏血酸氧化酶的 X 射线晶体学研究表明，从谱学研究中得到的结构基本正确。4 个铜离子相当接近地连接在一起，如图 4.6 所示。

表 4.3　生物体系中重要过渡金属中心的 EPR 谱特征

金　属	光 谱 细 节
Mn(Ⅰ)，高自旋	间隔为 90 Gs 的 6 根线，中心在 $g=2$
Cu(Ⅱ)，1 型	$g_x=2.036$，$g_y=2.058$，$g_z=2.227$，$A_z=45$，$A_x=A_y=4.5$ Gs
Cu(Ⅱ)，2 型	$g_{\parallel}=2.242$，$g_{\perp}=2.053$，$A_{\parallel}=170$ Gs
Cu(Ⅱ)，3 型	无 EPR 信号
Mo(Ⅴ)	$g=1.96+$（超精细分裂($I=5/2$)）
Mo(Ⅲ)	$g_{\perp}\approx 2$，$g_{\parallel}\approx 4$ ↑（超精细分裂）
Ni(Ⅲ)，低自旋	$g_{\perp}\approx 2.2$，$g_{\parallel}\approx 2.02$
Co(Ⅱ)，低自旋	$g\approx 2$，8 根超精细线，轴向
Fe(Ⅲ)，高自旋，正交	$g\approx 4.3$
Fe(Ⅲ)，高自旋，轴向	$g_{\perp}\approx 6$，$g_{\parallel}\approx 2.02$（例如，血红素）
Fe(Ⅲ)，低自旋，轴向	$g_x\approx 2.4$，$g_y\approx 2.2$，$g_z\approx 1.8$
$Fe_4S_4(SR)_4^{3-}$	$g\approx 1.88$，1.92，2.06
$Fe_4S_4(SR)_4^{-}$	$g\approx 2.04$，2.12
$Fe_2S_2(SR)_4^{3-}$	$g\approx 1.89$，1.95，2.04

正如已经指出的，EPR 技术对研究生物无机化学中的铁和铜是很重要的。就铁而言，Fe(Ⅱ)和 Fe(Ⅲ)两者的氧化态均能以低自旋和高自旋两种形式存在。EPR 谱很容易鉴别出铁离子的这些组态，g 和 A 参数提供了更多关于配位环境的信息（表 4.3）。现已对血红素中的铁和铁-硫簇合物进行了广延 EPR 谱的研究。EPR 谱在下面的研究中也证明了其不可估量的

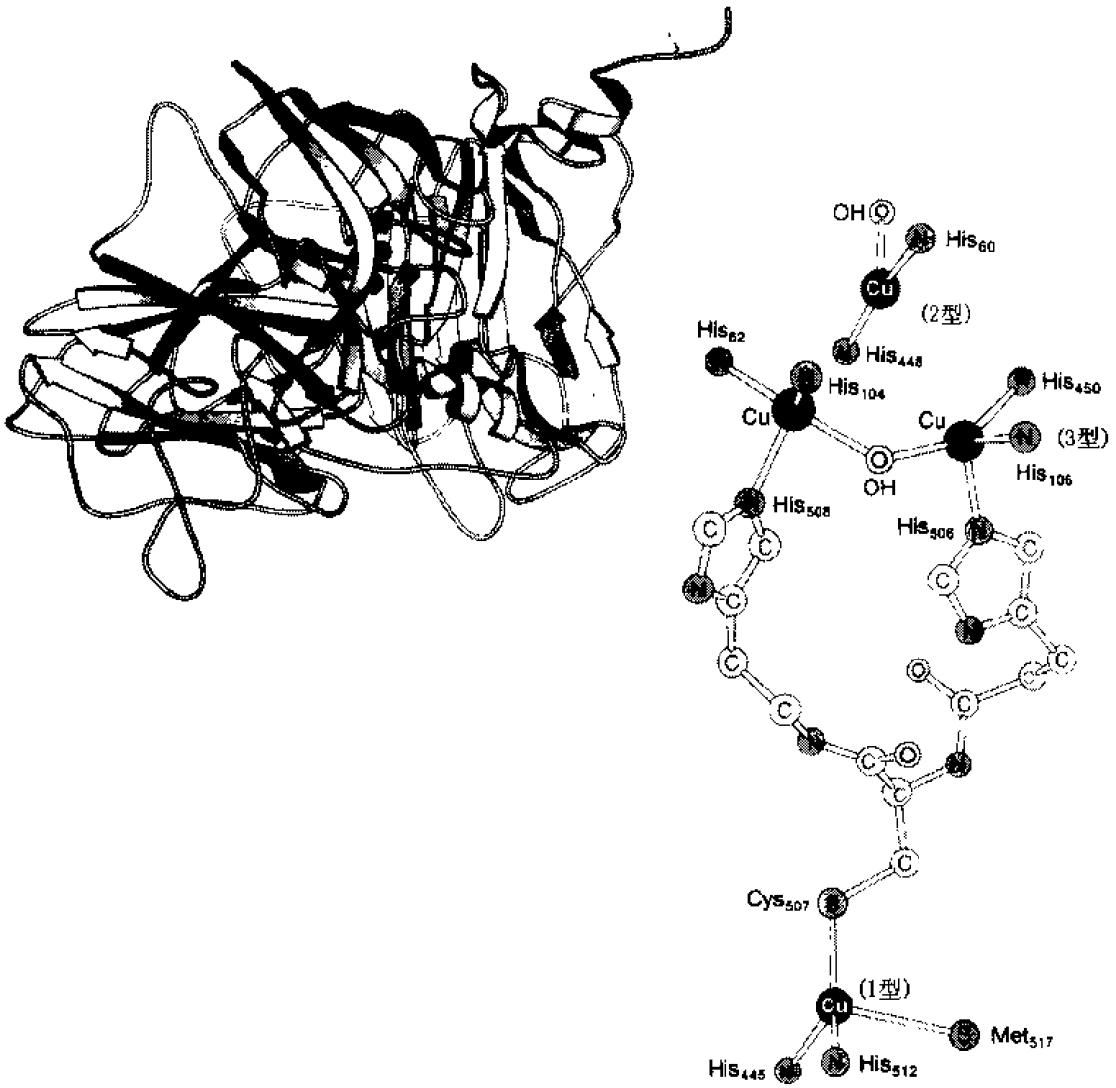


图 4.6　多铜酶中的抗坏血酸氧化酶结构

图中标明了 4 个铜部位和它们的空间相关性

作用：Mn(Ⅱ)($I=5/2$，给出 6 线超精细谱图)、涉及光合作用的聚锰原子簇、固氮酶和氧转移酶中的 Mo、维生素 B_{12}和相关配合物中的 Co 以及最近才研究出来的存在于甲烷产生菌中的氢化酶和其他酶中的 Ni。另外，在蛋白质与金属中心相邻的有机残基中也常常观测到 EPR 信号，例如，存在于核苷酸还原酶及超氧化物离子底物中的稳定酪氨酰基自由基，就能观测到 EPR 信号。在酶促反应中形成的自由基中间产物也曾用 EPR 谱来观测。

由 EPR 派生出的两个重要方法，近来已发现在生物无机化学研究中有应用价值。其中一个方法是电子-核双共振(electron-nuclear double resonance，ENDOR)谱，当一个二次辐照信号被扫描覆盖上可能会引起 EPR 线超精细分裂的配合物一同位素的 NMR 频率范围时，ENDOR 中的 EPR 跃迁被饱和，通常 EPR 线不能直接被分辨出来。样品在特定 NMR 频率下辐照，会引起 EPR 信号变为不饱和，而结果得到 ENDOR 信号。ENDOR 应用的典型例子是研究 ^{17}O标记的底物(例如，H_2O，O_2 或 H_2O_2)和 EPR 活性金属中心(例如铁卟啉)。另一种方法称为电子-自旋-反射包络调制(electron-spin-echo envelope modulation，ESEEM)谱，对鉴别配体的超精细相互作用也很方便。超精细有时也称为超超精细，以便和具有未成对自旋金属核的超

精细偶合相区别。这里，一连串两个或三个微波脉冲作用在EPR 空腔中的样品上，可监控由此产生的“自旋-反射”信号脉冲之间的时间后延作用的改变。这一原理与 NMR 自旋-反射实验所涉及的原理相似。这种方法可用来检测超超精细相互作用，例如，与 Cu(Ⅰ)或 Fe(Ⅱ)配位的组氨酸配体咪唑基上 N—H 的质子，因为氘代使观测到的效应对光谱指认给予确定。另一个应用是检测^{14}N和^{15}N核的超超精细相互作用。由超超精细偶合常数的大小，能估算出离开金属中心而进入配位体的电子的离域范围。这一信息在推论哪些是与底物分子结合的反应位置可能很有价值。

4.3.b 核磁共振谱(NMR)

核磁共振对于生物无机化学，如同对其他化学分支一样，多年来一直得到广泛应用。随着两个或多个时间变量的 Fourier 变换光谱(二维或更高维)的应用和发展，NMR 谱学的适用范围进一步加大，特别对于大分子结构的测定更为有效。从^{1}H到相对用得较少的 ^{13}C、^{15}N和 ^{31}P的 NMR 谱，可以获得有关生物高分子及所结合的金属离子的三维结构的信息，诸如从核的 overhauser 研究得到距离和从偶合常数得到扭转角。的确，现在已能用 NMR 方法测定较小的和中等大小的蛋白质完整的三维结构。这样的研究要求能全部指认出包含有几百个不同共振的 NMR 谱，同时也要求尽可能多地测量出质子间距和扭转角。NMR 技术极大地影响了生物无机化学中崭露头角的研究领域，其中包括蛋白质与核酸相互作用的锌结合域的研究。6 个不同类型的域结构均已被 NMR 谱测出。在所有这些测试中，在结构确定之前或者测定过程的同时，都要有组合相似的 X 射线结构分析辅佐。

顺磁金属离子具有相当快的电子自旋弛豫时间，由此不会使附近的质子共振谱线宽化而无法识别，由此能够产生适于鉴别氨基酸侧链配体的位移 NMR 信号。这种方法对天然存在的 Fe、Co 和 Cu 中心特别有用。无化学位移变换的谱线宽化存在于 Mn(Ⅱ)和 Gd(Ⅲ)的配位环境中，当这些金属取代了金属蛋白中的 Mg^{2+}、Ca^{2+}或 Zn^{2+}等反磁性金属时，能够从中获得远处基团的信息。顺磁过渡金属离子引起的谱线宽化对确定水对金属酶活性位的亲和性也很有用。

金属核的核磁共振谱研究还对这一技术本身也提供了的另一个很有效的应用领域。表4.4 列出了生物体中天然存在的，以及用作探针或药物的金属的核性质。最有用的是 $I=1/2$ 的金属核，因为它不存在四极谱线宽化。大部分天然存在的金属同位素有非常低的共振频率，这使得灵敏度很差，对所能得到的蛋白质浓度下很难观察到信号。而且，除了灵敏度非常低的 ^{57}Fe以外，所有核都是四极($I>1/2$)的，由此给出难以接受的宽谱线。因此，对 ^{111}Cd、^{113}Cd、^{203}Tl、^{205}Tl、^{195}Pt和 ^{207}Pb等 $I=1/2$ 的核，预料会得到最有用的结果。例如，抗癌药物铂及其 DNA 加合物的 ^{195}Pt NMR 结构研究，以及金属硫蛋白中 ^{113}Cd NMR 谱的研究都得到了有价值的结果。

最后，NMR 对于动力学研究也常常是很有用的。NMR 方法有极高的分辨率和窄的谱线宽度，其中核共振位置的差值常可被测量到百万分之几(ppm)，这对于在很宽的时标变化范围内相互转化的物种，能鉴别出信号来，也能观测到谱线的宽化。例如，两种在 300 MHz 频率下相差 1 ppm 的样品，只要它们相互转化的速率低于 $2\times10^{3}\ s^{-1}$，其共振谱就能被分辨出来。这种基于 NMR 的动力学方法已被用来测定$\{Fe_4S_4(SR)_4\}^{2-,3-}$核心的电子自交换速率，得出了 $3\times10^{6}(mol/L)^{-1}\cdot s^{-1}$的电子转移速率常数(见 9.1.a)。

表 4.4 重要元素的核性质

元素	原子序数	原子质量	自旋	天然丰度/(%)	NMR 频率 MHz(10 kGs)
H	1	1	1/2	99.985	
		2	1	0.015	
C	6	13	1/2	1.108	
N	7	14	1	99.63	
		15	1/2	0.37	
Na	11	23	3/2	100	11.262
Mg	12	25	5/2	10.13	2.6054
P	15	31	1/2	100	
S	16	33	3/2	0.76	
K	19	39	3/2	93.10	1.9869
		40	4	0.01	2.470
		41	3/2	6.88	1.0915
Ca	20	43	7/2	0.145	2.8690
V	23	50	6	0.24	4.245
		51	7/2	99.76	11.19
Cr	24	53	3/2	9.55	2.4065
Mn	25	55	5/2	100	10.501
Fe	26	57	1/2	2.19	3.8047
Co	27	59	7/2	100	11.285
Ni	28	61	3/2	1.19	12.089
Cu	29	63	3/2	69.09	2.663
		65	3/2	30.91	
Zn	30	67	5/2	4.11	
Y	39	90	2	放射性	
Mo	42	95	5/2	15.72	
		97	5/2	9.46	
Tc	43	99	9/2	放射性	
Cd	48	111	1/2	12.75	
		113	1/2	12.26	
In	49	111	9/2	放射性	
Gd	64	154～160		100	
Pt	78	195	1/2	33.8	
Tl	81	203	1/2	29.5	
		205	1/2	70.5	
Pb	82	207	1/2	22.6	

4.4 穆斯鲍尔(Mössbauer)谱

穆斯鲍尔(Mössbauer)谱的方法是,从处于激发态核能级的源元素核中,发射出的 γ-射线又被样品中的同一元素吸收,这对于研究生物无机化学中的 ^{57}Fe特别有意义。从与NMR 实验

表 4.5　铁化合物中穆斯鲍尔谱的同核素位移分类

铁氧化态	同核素位移 $\delta/(mm \cdot s^{-1})$
Fe^{2+}　(高自旋)	≈1.3
Fe^{3+}　(高自旋)	≈0.5～0.7
Fe^{2+}　(低自旋)	≈0.1
Fe^{3+}　(低自旋)	≈0

中的化学位移类似的同核素位移(δ,单位是 mm/s)中,能获得有关金属氧化态和自旋状态(表 4.5)以及铁的配体类型的某些信息。然而,从结构的观点看,最有用的是信号的四极分裂 ΔE_Q,它显示出围绕金属中心电场的不对称性。这些参数的含义在图 4.7 中给出,图中还给出了含短的 μ-O-Fe(Ⅱ)键的铁-氧蛋白中 $\{Fe_2O(O_2CR)_2\}^{2+}$ 核心的数据。这一特性导致电场发生轴向畸变,产生以这个化学单元为特征的较大的四极分裂(≈ 1.5～2.0 mm · s^{-1})。μ-氧键质子化形成 μ-羟基键物质,使 Fe-O 间距离增加到≈1.96 Å,并伴随 ΔE_Q 减少到 ≈ 0.4 mm · s^{-1}(图 4.7)。

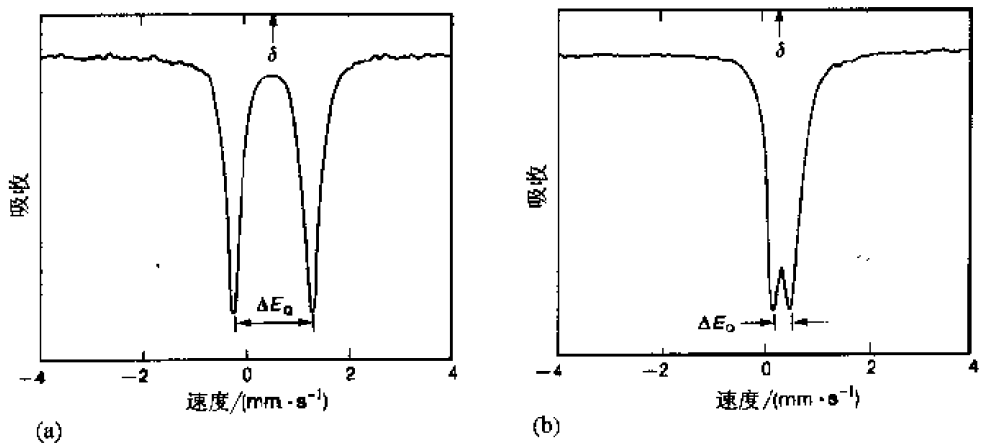


图 4.7　氧桥和羟基桥双铁配合物的穆斯鲍尔谱,给出了同核素位移(δ)和四极矩分裂(ΔE_Q)

(a) 氧桥物种 $[Fe_2O(O_2CCH_3)_2(HBPz_3)_2]$的谱图,这里的 $HBPz_3$ 是氢三吡唑基硼酸盐

(b) 羟基桥物种 $[Fe_2(OH)(O_2CCH_3)_2(HBPz_3)_2]$的谱图

注意:(a)中的大 ΔE_Q 值是由于Fe(Ⅱ)配位几何构型的低对称性

生物无机化学中应用 ^{57}Fe穆斯鲍尔谱的一个缺点是该同位素的天然丰度低(表 4.4),经常需要对脱辅基的金属蛋白进行重组来富集,如果这种方法行不通,则要从大量富含 ^{57}Fe铁盐的介质中来富集。对于生物体中的铁原子簇穆斯鲍尔谱可用于研究磁偶合现象,对于混合价态的物种,可估算内部的电子转移反应速率。穆斯鲍尔谱方法 10^{-7}s 的时标(表 4.1)很适合这一研究。^{57}Fe的穆斯鲍尔谱对区分固氮酶中不同种类的 Fe-S、Fe-Mo-S 原子簇,以及铁的形式氧化态有特别的价值。在外部磁场存在时,这些研究用温度相关的波谱测量很方便,所用温度可低至 4.2 K,波谱的计算机模拟可得到同核素位移、四极分裂以及核-电子磁超精细偶合参数。虽然 ^{57}Fe在生物无机化学穆斯鲍尔谱的应用技术中起主导作用,但其他可用的核还有 ^{40}K、^{61}Ni和 ^{67}Zn。

4.5 电子光谱和振动光谱

不同电子能级之间的跃迁引起能量在紫外、可见区吸收，对许多过渡金属配合物来说，电磁光谱还可能在近红外区。振动能级间的跃迁则能量更低，全部在红外区域。电子光谱和振动光谱两者在探测金属生物分子的结构和电子性质方面具有极大的应用价值。

4.5.a 电子光谱

金属配合物中的电子光谱有三个主要来源：如在卟啉中发现的内部配体的谱带；仅仅与金属轨道有关的跃迁，如 d-d 跃迁光谱；以及在金属和配体之间的电荷迁移光谱。重要金属蛋白生色团的一些特点列于表 4.6。这些光谱性质已用于指认金属的氧化态，并根据反应来鉴别新近发现的体系的化学物种。在金属酶中，配位环境最有价值的特征光谱能够得到保留。当几种金属同时存在时，例如，细胞色素 *c* 氧化酶中的存在两个血红素中心和两个铜中心，我们的任务就是鉴别出单个金属中心本身所特有的谱带。指认光谱的两个途径是，有选择地消耗蛋白质中一个或者几个这样的中心，或者选择性地改变氧化态，从而改变特定生色团的电子光谱。一般说来，要在多金属蛋白中指认出不同的光谱带对应的特定金属中心，不是一件简单的事。但如果能获得这样的信息，就能根据这些信息，勾画出经过金属生色团到达底物的电子转移反应的路径。例如，在细胞色素 *c* 氧化酶中，光谱和其他谱学研究表明，电子从细胞色素 *c* 首先经铜 A 中心进入，然后四电子还原双氧生成水，这一过程发生在双核血红素 a_3-铜 B 部位。

表 4.6 金属蛋白光谱的一般特点

生色团	主要谱带	谱带指认
血红素[Fe(Ⅱ)/Fe(Ⅲ)]	400～500 nm (Soret)	$\pi\rightarrow\pi^*$
	500～600 nm (α,β)	$\pi\rightarrow\pi^*$
Fe(Ⅱ)O_xN_y	与几何构型相关	d→d
		O→Fe(Ⅲ)
		(LMCT)
铁-硫($Fe^{Ⅱ/Ⅲ}$-S_t)	350～600 nm	S→Fe(Ⅲ)
	近红外	(LMCT)
		d→d
探针[Co(Ⅱ)/Ni(Ⅱ)]	与几何构型相关	d→d
		(LMCT)
铜蓝[Cu(Ⅱ)N_2S_2]	≈600 nm	S→Cu(Ⅱ)
	近红外	(LMCT)
		d→d

除应用常规的 UV-可见吸收光谱以外，还有一些测定电子转移反应的相关方法，可深入了解生物中金属的电子结构。我们已经提到过的一种方法是近吸收边 XAS，即 X 射线光子激发一个 1s 电子到空的、接近连续谱的束缚态。这一技术已经成功地用来确认双核铁氧合蛋白的氧化态，例如对甲烷单加氧酶，已经得到其中的 Fe(Ⅱ)Fe(Ⅱ)、Fe(Ⅱ)Fe(Ⅲ)以及 Fe(Ⅲ)Fe(Ⅲ)的氧化还原程度的图像。XAS 方法可测试含金属的样品对可变波长光子的吸收。相应的实验是用固定波长的 X 射线或高能紫外光作光源来电离内层电子，并分析发射出的光电子

能量。这一方法是XPS和UPS的基础。XPS即X射线光电子能谱,或称ESCA,即用于化学分析的电子光谱;UPS即紫外光电子能谱,X射线或真空紫外线分别作为光源。对于某些元素,特别是Fe、Co、Ni和Cu,当化学环境变化时,内层电子结合能具有的位移可在8～11 eV。ESCA和UPS方法在生物无机化学研究中还有很多应用潜能待开发。

4.5.b 振动光谱

可以想像,蛋白质的振动光谱是非常复杂的。然而,金属中心与电子跃迁相关联的金属蛋白则有一特殊的优点,即能产生共振Raman谱,其中配体的振动得到明显强化。与现代化仪器手段并用,包括能激发可见和近紫外等波长范围很宽的可调激光器的应用,共振Raman谱的研究给出了金属蛋白中配位体的重要结构细节。当在分子中存在着强烈的配体向金属的电荷迁移电子跃迁,诸如金属硫醇盐、酚氧盐及金属-叠氮配合物等就特别有价值。研究中心生色团的共振Raman光谱,能分别鉴定出半胱氨酸、酪氨酸或外源性叠氮化物(N_3^-)的配位情况。如果配体振动频率的光谱范围与蛋白质的谱带几乎没有重叠,或谱带的强度很大,则红外和共振Raman两种方法都适用。一氧化碳和双氧结合在血红蛋白和血蓝蛋白等O_2输运蛋白上的研究就是其应用实例。

另一个已经应用到生物无机结构测定的振动光谱方面的技术进步,是在线计算机的发展和Fourier变换方法的应用。溶剂和蛋白质基质的背景信号通常能被差分光谱平均,这里两种形式的金属蛋白的光谱能相互扣除。两种形式可能是有或无被添加入的底物或抑制剂分子,或者同位素取代配体的衍生物,如^{16}O-^{16}O和^{18}O-^{18}O,或H_2O和D_2O。和EXAFS谱类似,使用激光Raman谱必须要注意,在辐照过程中和辐照后都要保持生物样品的化学完整性,如果方便的话,最好进行活性监测。

4.5.c 圆二色性(CD)和磁圆二色性谱(MCD)

圆二色性(Circular Dichroism,CD)与左圆偏振光和右圆偏振光被光活性样品吸收的差值相关。CD谱在生物无机化学上有若干重要应用。首先,CD对检测和分辨电子跃迁很有用,而用简单的吸收光谱来分析则较难。这是由于CD谱和吸收光谱的选律不同,CD谱带可以是正的或者负的,因此,如果符号不同,在吸收谱中重叠的谱带在CD谱中就可以被清晰地分辨出来。其次,CD谱是检测生物大分子二级结构的有力工具。不同类型的多肽二级结构,对应于肽羰基基团的紫外区域吸收,则有明显不同的CD谱。因此,有可能从蛋白质的CD谱估算α-螺旋、β-折叠片以及其他结构形式的数量。另外,CD谱能够用于跟踪多肽中折叠-去折叠转变。CD谱也能用来检测核酸的二级结构,例如,可清楚地区分DNA的B形式和Z形式。

尽管只有手性分子有CD谱,但所有分子在磁场存在时都会显示出CD谱。测试这一现象的技术称为磁圆二色性(Magnetic Circular Dichroism,MCD)谱。虽然要对大部分实际应用中获得的光谱作细致的理论分析很复杂,但在意义明确的某些情况下,MCD方法对鉴别结合的配体能提供有力的指纹特征。MCD的一个实际的应用,就是确认在细胞色素P-450和在氯过氧化物酶中,与血红素中心的低自旋铁配位的硫醇盐配体的存在。为了说明这一方法的意义,图4.8中同时给出血红素中心以及一个模型化合物的MCD谱。当诸如Zn^{2+}这样的金属没有光谱信号时,用Co^{2+}取代该金属可得到有用的MCD谱。羧肽酶、碳酸酐酶和碱性磷酸酶中的Zn^{2+}中心结构,都由Co^{2+}取代的相应化合物来探测。因为MCD能用作指纹鉴定方法,与设计

好的模型化合物相比较是必不可少的。除了作为指纹鉴定方法有意义外，MCD 也用来表征金属蛋白中的顺磁金属中心。在这一应用中，在低温下监控 MCD 光谱与温度和磁场的相关性，可获得有关磁自旋态的信息。这种方法已广泛用于铁-硫蛋白和血红素蛋白的研究工作中。

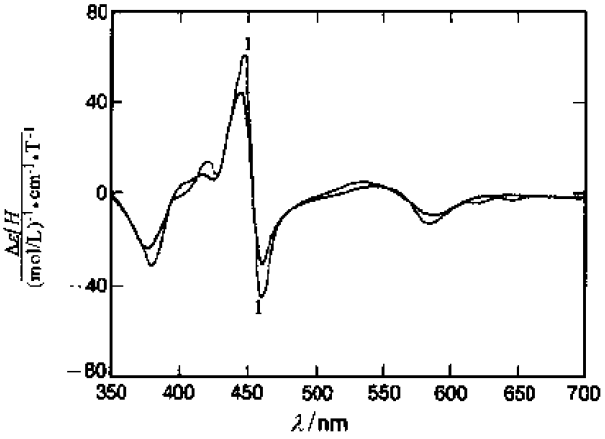


图 4.8　血红蛋白的磁圆二色谱

细胞色素 P-450 的铁(Ⅰ)-一氧化碳衍生物(曲线 1)以及一个恰当的模型配合物，即结合于一氧化碳上的亚铁原卟啉Ⅸ的苯硫醇盐配合物［引自 J. H. Dawson and M. Sono, *Chemical Reviews* 87, 1255～1276(1987)］

4.6　磁 性 测 量

光学、EPR 和穆斯鲍尔谱均可表征生物中金属离子的电子态，与此密切相关的方法是直接测量磁矩。直到最近，这种方法只能用于金属蛋白核心的小分子模型化合物，因为样品中非金属蛋白质和高水含量对磁性质有很大的反磁贡献。然而，超导量子干涉装置(superconducting quantum interference device，SQUID)的磁感应仪则具有更高的灵敏度，对直接研究金属蛋白的磁性质更为适宜。对具有未成对电子的大部分物质，磁化率(χ)随温度(T)而变化，因此，磁矩以及未成对电子数通常可从温度相关性的研究中推导出。除了用 SQUID 或其他磁力仪直接测量磁矩外，测量生物样品中感受到的顺磁中心磁场的 EPR 信号强度或核的 NMR 谱的化学位移，从 χ 对 T 的相关性推出磁矩，这种方法也是可行的。

当两个或多个磁性中心由桥式配体连接时，它们的电子自旋能相互抵消或增强，这一现象是分别由反铁磁或者铁磁偶合引起的。这种情况在生物无机化学中相当普遍，特别是反铁磁偶合。根据偶合的强弱，可测定磁交换偶合参数 J，这样的偶合从量子力学角度看，类似于 NMR 谱的自旋-自旋偶合。测得 J 的单位是 cm^{-1}，$J<0$ 对应反铁磁自旋交换，$J>0$ 为铁磁相互作用，这里自旋 Hamiltonia 量 $H = -2JS_1 \cdot S_2$。自旋矢量 S_1 和 S_2 是指两个被偶合的金属中心。对反铁磁偶合，基态总自旋(S_T)在偶电子体系中为零，在奇电子体系中 $S_T = 1/2$。在液氦温度下，偶电子体系是反磁性的，没有 EPR 信号或者在穆斯鲍尔谱中无磁场分裂，磁化率与脱辅基蛋白无区别。奇电子体系($S_T = 1/2$)则有带未成对电子的、孤立金属中心的磁性特征。当 $|J|$ 减小而且温度升高时，磁性质反映了电子-自旋多重性的较高能态。这一过程可直接通过 χ 和温度的关系来研究，并拟合出多金属中心的电子结构理论模型。这样的工作对表征双金属中心很有价值，例如血蓝蛋白中的{Cu(Ⅱ)}$_2$ 和超氧化物歧化酶衍生物中的 Cu_2Cu_2，双核铁氧合

蛋白、蚯蚓血红蛋白、核苷酸还原酶、甲烷单加氧酶及紫酸磷酸酯酶中的{Fe(Ⅲ)}$_2$和{Fe(Ⅲ)Fe(Ⅱ)}，铁硫蛋白中的$Fe_mS_n^{q-}$以及细胞色素 c 氧化酶中的铁-铜中心。

4.7 还原电位测定

金属生物无机分子的许多物理和化学性质，反映了生物功能要求的一些氧化还原态的可及性。其实例既包括单核体系，诸如 Cu(Ⅰ)/Cu(Ⅱ)、Fe(Ⅱ)/Fe(Ⅲ)、Co(Ⅰ)/Co(Ⅱ)/Co(Ⅲ)和 Mo(Ⅳ)/Mo(Ⅴ)/Mo(Ⅵ)，也包括多金属中心。为了理解这些氧化还原活性物质的生物无机化学行为，我们通常要知道它们的氧化还原电位。测定金属蛋白核心的氧化还原电位的经典方法，是用电位相似的氧化还原剂进行电位滴定，观测蛋白质的吸收光谱或 EPR 谱随着试剂加入后的变化。为了促进电子向金属中心转移，有时需要用具有氧化还原活性的有机小分子作中介体，携带电子到蛋白质中心，当然必须注意，中介体不改变蛋白质的氧化还原性质。最近，已经在不同的电极上获得氧化还原活性蛋白的直接电子转移反应，其中包括热解石墨、氧化钌和改性金等电极。较早用电化学方法测量氧化还原电位的尝试，曾由于电极表面对蛋白质的强吸附而无法实现，例如细胞色素 c 吸附到汞电极上。一个准可逆电极与细胞色素 c 的快速反应，发生的包含有被吸附的 4,4′-联吡啶基的金电极上。在电极表面存在这样的物质可能有利于蛋白质的快速结合与解离，这对电化学测量是必需的。由于 4,4′-联吡啶基是非氧化还原活性的，因此它被看作是电子转移的促进剂，而不是中介体。不是所有金属蛋白都能用生物电化学方法研究，因为氧化还原活性中心不大可能完全接近蛋白质表面，使得电子能在电极表面快速转移。测定蛋白质氧还电位的生物电化学方法，也有可能应用在生物传感器研究领域。例如，共价吸附着二茂铁的电极可用来监控胆固醇的含量。胆固醇氧化酶是一种黄素蛋白，它能被胆固醇还原，接着又被吸附在电极表面的二茂铁离子重新氧化。再次氧化结合在表面的二茂铁，需要的电流与胆固醇的含量水平相关联。有关的一些应用已经叙述过，预期还会有更多的应用。

4.8 电子显微探针分析

这一方法是检测由高度聚焦的电子束轰击样品产生的 X 射线发射。它可以达到 1μm 的空间分辨率，想要探测的生物基元可小到 10^{-15}g，X 射线发射光谱具有被测元素的特征。用这一方法可测定在小鼠肝细胞中线粒体和内质网中钙的含量，以及 Wilson 氏病患者的角膜间隙中的定域铜，因为这类患者失去了从细胞中清除铜的代谢能力。质子诱导 X 射线发射(PIXE)是与此相关的方法，其中用质子束代替电子束来激发原子。当要解决与纤维中特定金属离子区划有关问题时，这类技术无疑将在生物无机化学界受到更多关注。

习　题

1. 对于 ^{57}Fe穆斯鲍尔谱实验使用的 14.4 keV γ 射线，计算以秒为单位的大约时间标度，这里 $E=hc/\lambda$，换算因子 1 keV$=8.07\times10^{6}$cm^{-1}。你从计算中得到的值与表 4.1 中给出的值应该协调一致。
2. 研究固氮酶的生物无机化学时，假设你收集到具有 Mo(Ⅴ)的 EPR 谱的中间体。^{95}Mo和 ^{97}Mo都有 $I=5/2$，两者加和具有≈25%的丰度。给出你预料的 EPR 谱简单谱图，标明图中的轴，并指出预期的 g 值。如果你配制与富^{13}C的氰离子($I=1/2$)为 1∶1 的加合物，它可能对光谱有何影响？
3. 在金属蛋白中用 Co^{2+}取代 Zn^{2+}是一个取代探针的例子。这对于用 EPR 方法、光谱以及其他谱学方法

表征金属中心提供了很大的方便。用这样的研究方法，可预期得到哪些信息？请进行讨论。

4. 某合作者分离出了一种铜酶，能在O_2存在时，催化油渣使其转化为可溶性的醇。每个组成单一多肽链的蛋白含有2个铜原子。你作为研究这一课题的生物无机化学家，为了测定蛋白质的活性位结构，给你提供的蛋白不限量，且能自由使用很多物理技术，包括NMR和EPR谱、磁感应仪、Mössbauer仪、X射线吸收光束、UV-可见光谱仪、Raman谱仪、磁圆二色仪，但却没有X射线衍射仪。在向同事报告结果前，你只有时间完成三项测试。描述你准备进行的测试，什么顺序最合适，预测可能得到哪些结果，如何用这些信息从结构上来表征双铜中心。在讨论中，应包括期望鉴定的配体种类以及如何用这些方法得出你的判定。

参 考 文 献

一般参考文献

C. R. Cantor and P. R. Schimmel. 1980. *Biophysical Chemistry*, Volumes 1~3. W. H. Freeman, San Francisco.

R. S. Drago. 1992. *Physical Methods for Chemists*, 2nd ed. Saunders College Publishing, Fort Worth, TX.

J. R. Wright, W. A. Hendrickson, S. Osaki, and G. T. James. 1986. *Physical Methods for Inorganic Biochemistry*. Plenum Press, New York.

时标

R. G. Bryant. 1983. "The NMR Time Scale." *J. Chem. Ed.* 60, 933~935.

E. L. Muetterties. 1965. "Stereochemically Nonrigid Structures." *Inorg. Chem.* 4, 769~771.

X射线方法

R. E. Dickerson. 1992. "A Little Ancient History." *Pro. Sci.* 1, 182~186.

J. P. Glusker and K. N. Trueblood. 1985. *Crystal Structure Analysis: A Primer*, 2nd ed. Oxford University Press, New York.

R. G. Shulman, P. Eisenberger, W. E. Blumberg, and N. A. Stombaugh. 1975. "Determination of the Iron-Sulfur Distances in Rubredoxin by X-Ray Absorption Spectroscopy." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 4003~4007.

G. H. Stout and L. H. Jensen. 1989. *X-Ray Structure Determination*, 2nd ed. Wiley-Interscience, New York.

B. K. Teo. 1986. *EXAFS: Basic Principles and Data Analysis*. Springer-Verlag, New York.

磁共振方法

I. Bertini and C. Luchinat. 1986. *NMR of Paramagnetic Molecules in Biological Systems*. Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA.

A. J. Hoff, ed. 1989. *Advanced EPR-Application in Biology and Biochemistry*. Elsevier, Amsterdam.

B. M. Hoffman. 1991. "Electron Nuclear Double Resonance (ENDOR) of Metalloenzymes." *Acc. Chem. Res.* 24, 164~170.

D. J. Lowe. 1992. "ENDOR and EPR of Metalloproteins." *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 57, 1–22.

C. A. Reed and R. D. Orosz. 1993. "Spin Coupling Concepts in Bioinorganic Chemistry," in C. J. O'Connor, ed., *Research Frontiers in Magnetochemistry*. World Scientific Publishing, London, 351~393.

H. Sigel, ed. 1986. *Applications of NMR to Paramagnetic Species. Metal Ions in Biological Systems*, Volume 21. Marcel Dekker, New York.

H. Sigel, ed. 1987. *ENDOR, EPR, and Electron Spin Echo for Probing Coordination Sphere. Metal Ions in Biological Systems*, Volume 22. Marcel Dekker, New York.

J. E. Wertz and J. R. Bolton. 1986. *Electron Spin Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*. Chapman and Hall, New York.
K. Wüthrich. 1986. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. Wiley-Interscience, New York.

穆斯鲍尔谱

G. M. Bancroft. 1973. *Mössbauer Spectroscopy: An Introduction for Inorganic Chemists and Geochemists*. McGraw-Hill, Maidenhead, U.K.
D. P. E. Dickson and F. J. Berry, eds. 1986. *Mössbauer Spectroscopy*. Cambridge University Press, New York.
P. Gütlich, R. Link, and A. Trautwein. 1978. *Mössbauer Spectroscopy and Transition Metal Chemistry*. Springer Berlin.
G. J. Long, ed. 1984~1989. *Mössbauer Spectroscopy Applied to Inorganic Chemistry*, Volumes 1~3. Plenum Press, New York.

电子光谱和振动光谱

W C. Johnson, Jr. 1990. "Protein Secondary Structure and Circular Dichroism: A Practical Guide." *Proteins: Struct., Func., and Gen.* 7, 205~214.
A. B. P. Lever. 1984. *Inorganic Electronic Spectroscopy*, 2nd ed. Elsevier, New York.
K. Nakamoto. 1986. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic Coordination Compounds*, 4th ed. Wiley-Interscience, New York.
T. G. Spiro, ed. 1987. *Biological Applications of Raman Spectroscopy*, Volumes 1 and 2. Wiley-Interscience, New York.

圆二色性和磁圆二色性谱

M. K. Johnson, A. E. Robinson, and A. J. Thomson. 1982. "Low-Temperature Magnetic Circular Dichroism Studies of Iron-Sulfur Proteins," in T. G. Spiro, ed., *Iron-Sulfur Proteins*. Wiley-Interscience, New York, 367~406.

磁性测量

C. J. O'Connor. 1982. "Magnetochemistry: Advances in Theory and Experimentation." *Prog. Inorg. Chem.* 29, 203~283.

氧化还原电位测量

F. Armstrong, S. J. George, A. J. Thomson, and M. G. Yates. 1988. "Direct Electrochemistry in the Characterization of Redox Proteins: Novel Properties of *Azotobacter* 7Fe Ferredoxin." *FEBS Lett.* 234, 107~110.
J. E. Frew and H. A. O. Hill. 1988. "Direct and Indirect Electron Transfer Between Electrodes and Redox Proteins." *Eur. J. Biochem.* 172, 261~269.
H. A. O. Hill. 1987. "Bio-Electrochemistry." *Pure and Appl. Chem.* 59, 743~748.

电子探针分析

A. J. Morgen. 1985. *X-Ray Microanalysis in Electron Microscopy for Biologists*. Oxford University Press, New York.
J. Sommerville and U. Scheer, eds. 1987. *Electron Microscopy in Molecular Biology: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford.

第5章　生物体内金属单元的选择、摄取和组装

5.1　金属离子的生物利用率
5.2　低丰度金属的富集策略和细胞内化学
5.3　金属簇的自发自组装
5.4　特定结构单元

在金属蛋白活性中心中，自然界利用相对丰富、动力学活性而热力学稳定的单元。易变性有利于金属核的组装和反组装以及底物的快速缔合和解离。对于某一特定作用，低丰度金属离子的选择可以通过能量驱动(energy-driven)过程实现，能够以被动扩散或经过特定离子通道的方式进入细胞。金属结合的辅助因子，已发展成为用于提高在生理条件下不溶性金属离子的生物利用率，以及有效地螯合活性金属中心，使之作为"生物无机元件"插入金属蛋白的活性部位。在地球上发现的自组装金属簇也类似地被用于无机体系特定作用。

令人感兴趣的是，在周期表中的所有无机元素中，只有少数几种在生物体系得到利用。最经常遇到的是碱金属和碱土金属离子 Na^+、K^+、Mg^{2+}和 Ca^{2+}，被用于平衡简单无机离子如磷酸根和硫酸根以及更复杂的种类，如三磷酸核苷、DNA、和RNA 的电荷。许多第一序列过渡金属，特别是铁、铜、和锌离子，在生物体系中也起着重要的作用。随着人们逐渐认识到这些稀有元素的重要性，钒、锰、钴、镍和钼(自然界惟一存在的第二序列过渡元素)的生物无机化学也在迅速发展。钨最近也被列为生物金属系列。自然界为什么选择利用这些特定元素的性质？虽然已知无机化学性质表明某些元素具有一定的潜在价值，但自然界为什么没有选择利用这些元素的性质？例如，已知钴元素的化合物能可逆地同氧结合，但为什么没有一种含钴的呼吸蛋白作为氧传输体？

正如从本章将要讨论的实例中可以看到的，支配金属离子应用的因素之一是它们的相对丰度。铁是地壳中最丰富的过渡金属。因此，铁作为许多生物无机体系的重要组分，并不使人感到意外。金属蛋白的活化中心是由动力学活性而热力学稳定的单元组成的。可以从这个事实推断出支配金属离子应用的第二个因素。活性有利于金属核的快速组装和拆卸以及底物的快速缔合和解离。无机化学中因它们的动力学惰性而众所周知的金属离子如 Cr^{3+}和 Co^{3+}，在生物无机化学中很少被利用。类似地，更为惰性的第二、第三序列的过渡元素，在生物无机化学中几乎不起任何作用。尽管它们在化学工业均相和多相催化剂中具有十分重要的价值。事实上，如果这些重要过渡金属离子存在于细胞内，它们可能是有毒性的。因此，它们的摄取和传输机理已经受到关注。正如第一章所陈述的，铼、铂和金的配合物，在医药中都起着一定的作用。它们在细胞中的进入和代谢机理，也是人们感兴趣的研究课题。

为了某一具体目的而需要一个特定金属离子的时候，该特定金属离子可以通过细胞内的驱动能量过程而被富集。这种现象的一个著名例子是钒被摄取到某些海洋生物体内。伴随

ATP 需求反应的发生，该元素以五倍的量被从海水中富集到被称为 vanadocytes 的被囊类和海鞘类的血细胞中。这些细胞干重每公斤含有约 27 g 钒，是铁含量的 100 多倍。一些被囊类动物中积累有在生物学中很少遇到的金属，包括 Ti、Cr，甚至 Nb。钒以及其他元素在海鞘类动物中的作用还不清楚，目前处在研究之中。

为了优化特定功能，生物体中金属离子的性质被它们所处的局部环境所减弱。然而，在某些情况下，可利用的氨基酸残基不能完成这一任务。弥补这一缺陷的一个方法是利用含有特定有机官能团的辅助因子。通过特定有机官能团调整它们的无机客体的性质。正如在第 3 章简要提到的，如卟啉和咕啉这些辅助因子，在许多不同的蛋白质中经常遇到，肽链中附加配体能够进一步减弱金属离子的性质。这些单元作为很有用的“生物无机元件”，非常类似于现代电子设备中的固体元件，当需要它们的特定功能时，才将它们插入。另一类生物无机元件是金属原子簇，这是无机化学家非常熟悉的单元。铁-硫簇如 $\{Fe_4S_4\}^{2+}$ 经常在蛋白质中被发现，它们在蛋白质中起着传递电子的重要作用。另外，如 Fe_3O_4，或磁铁矿等在自然界中被细菌、鸽子、蜜蜂以及人类用于导航和定向的手段。自然界从岩石圈吸取化学物质为生物界所用的能力是十分令人惊奇的，并且形成了一个中心原则，据此我们能够更好地理解生物体中金属单元的选择。

5.1 金属离子的生物利用率

表 5.1 列出了在地壳和海水中发现的无机元素的相对丰度。将该资料与表 1.1 相比较可以看出，生物体中必需金属的丰度较非必需金属的丰度相对高些。某些高丰度的金属离子，如钛，在生物体中的作用还未被人们所了解。这种低利用性可能与该元素的常见离子 Ti^{4+} 在生物体内 pH 6～8 环境中的溶解和流动困难有关。

表 5.1 地壳和海水中元素的相对丰度[a]

元素	地壳平均 (ppm)	海水 (mg/L，即 ppm)	元素	地壳平均 (ppm)	海水 (mg/L，即 ppm)
H	1.40×10^{3}	1.1×10^{-1}	Rh	5×10^{-3}	
Li	20	0.17	Pd	1×10^{-2}	
Be	2.8	6×10^{-7}	Ag	7×10^{-2}	3×10^{-4}
B	10	4.5	Cd	0.2	1×10^{-4}
C	200	28	In	0.1	$<2\times10^{-2}$
N	20	0.7	Sn	2	8×10^{-4}
O	4.66×10^{5}		Sb	0.2	3×10^{-4}
F	625	1.3	Te	1×10^{-2}	
Na	2.83×10^{4}	1.1×10^{4}	I	0.5	6×10^{-2}
Mg	2.09×10^{4}	1.35×10^{3}	Cs	3	3×10^{-4}
Al	8.13×10^{4}	1×10^{-3}	Ba	425	2×10^{-2}
Si	2.77×10^{5}	3	La	30	3×10^{-6}
P	1.05×10^{3}	9×10^{-2}	Ce	60	1×10^{-6}
S	260	9×10^{2}	Pr	8.2	6×10^{-7}
Cl	130	1.9×10^{4}	Nd	28	3×10^{-6}
K	2.59×10^{4}	3.9×10^{-2}	Sm	6.0	5×10^{-7}
Ca	3.63×10^{4}	4.1×10^{2}	Eu	1.2	1×10^{-7}
Sc	22	$<4\times10^{-6}$	Gd	5.4	7×10^{-7}

续表

元素	地壳平均 (ppm)	海水 (mg/L,即 ppm)	元素	地壳平均 (ppm)	海水 (mg/L,即 ppm)
Ti	4.40×10^{3}	1×10^{-3}	Tb	0.9	1.4×10^{-6}
V	1.35	2×10^{-3}	Dy	3.0	9×10^{-6}
Cr	100	5×10^{-4}	Ho	1.2	2×10^{-6}
Mn	950	2×10^{-3}	Er	2.8	9×10^{-6}
Fe	5×10^{4}	3×10^{-3}	Tm	0.5	2×10^{-6}
Co	25	4×10^{-4}	Yb	3.4	8×10^{-6}
Ni	75	7×10^{-3}	Lu	0.5	1×10^{-6}
Cu	55	3×10^{-3}	Hf	3	$<8\times10^{-6}$
Zn	70	1×10^{-2}	Ta	2	$<3\times10^{-6}$
Ga	15	3×10^{-5}	W	1.5	1×10^{-4}
Ge	1.5	7×10^{-5}	Re	1×10^{-4}	8×10^{-6}
As	1.8	2.6×10^{-3}	Os	5×10^{-3}	
Se	5×10^{-2}	9×10^{-9}	Ir	1×10^{-3}	
Br	2.5	67	Pt	1×10^{-2}	
Rb	90	0.12	Au	4×10^{-3}	1×10^{-5}
Sr	375	8	Hg	8×10^{-2}	2×10^{-4}
Y	33	1×10^{-6}	Tl	0.5	$<1\times10^{-4}$
Zr	165	3×10^{-5}	Pb	13	3×10^{-5}
Nb	20	1×10^{-5}	Bi	0.2	2×10^{-5}
Mo	1.5	1×10^{-2}	Th	7.2	$<5\times10^{-7}$
Ru	1×10^{-2}		U	1.8	3×10^{-3}

[a] 摘自：Compiled from B. Mason and C. B. Moore. 1982. *Principles of Geochemistry*, 4th ed. Wiley, New York (1982), Tables 3.5 and 9.3.

自然界是如何将金属离子从它们的矿物形态中提取出来，并将它们插入到生物环境中的呢？对于许多离子，如 Na^{+}、Mg^{2+} 或 Zn^{2+}，在需要达到毫摩尔浓度的情况下，溶解度不存在特别的问题。但是，有些元素如铁，在中性 pH 情况下，由于溶解度太低（见表 2.3）以致不能容易地被生物体所利用。除了溶解度之外，金属离子还必须能够被细胞所吸收。这种现象还没有被完全理解。如图 5.1 所示，有两种可能途径。某些金属离子如钠穿过细胞膜上的特定通道和泵。我们将在第6章讨论这个有趣的现象。对于其他离子，一些特殊的螯合配体可以使它们很容

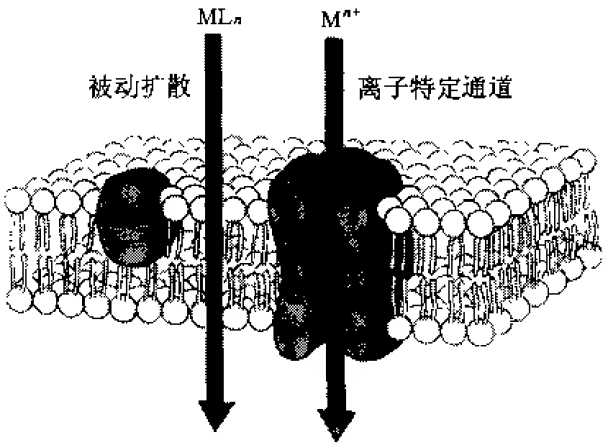


图 5.1　细胞吸收金属离子的两种途径（被动扩散和经过特定离子通道）传递示意图

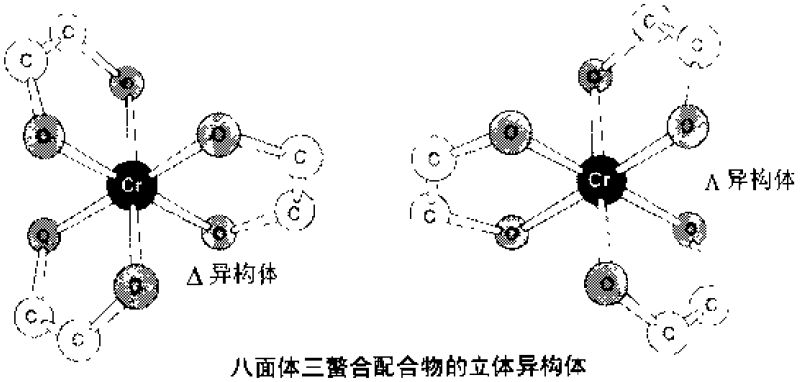
易地通过细胞膜。

人们已经较深地了解细菌促进的铁的溶解和流动，此过程利用了经典配位化学的许多概念。因此，我们将对该例子进行较为深入的论证。此过程所包含的原理可能适用于其他金属离子的生物利用率。正如前面所提示的，只有很少数的水合铁离子可以被细胞所摄取。为了溶解铁，微生物进化出能与 Fe(Ⅲ)紧紧结合的被称为铁质体 (siderophores) 的螯合剂。铁质体被细菌释放到它所处的环境，并将铁以复杂的形式溶解并螯合，该螯合物可以被专一地摄取到细胞内，并在那儿将铁释放出来。研究最深入的一种铁质体是以儿茶酚为底物的肠杆菌素(ent)，如图 3.24 所示。肠杆菌紧密地与 Fe(Ⅲ)结合在一起，其总的生成常数 K_f 为 10^{49}，如式 5.1 所示：

$$K_f=[Fe(ent)^{3-}]/([Fe^{3-}][(ent)^{6-}]) \tag{5.1}$$

该数值对应于在 pH 7.0，将游离肠杆菌素配体的质子化考虑在内时的表观离解常数 10^{-25}。为了理解如此紧密的结合，需要进一步研究细胞内铁释放的机理。正如我们将要讨论的，所产生的－3 价铁配合物阴离子是可溶的，并且可以被快速地传递到细胞内。

有关铁-肠杆菌素配合物结构的信息，已经通过系统的实验推理出来。肠杆菌素的铁配合物具有类似于三(儿茶酚)铁(Ⅲ)配合物的旋光吸收光谱。这个结果表明，配体是以儿茶酚 2 价阴离子而不是以一个酰胺的氧原子和每个芳香环的一个环氧原子参与配位的。而且，该配合物具有光学活性，表明在以铁为中心的两个可能绝对构型中，其中之一占主导地位。这种情况出现的原因是如下图所示 Λ 和 Δ 两种异构体形成的。



八面体三螯合配合物的立体异构体

因为肠杆菌素的三内酯环具有手性中心，并且都为 S 构象，所以在铁处的 Λ 和 Δ 异构体为非对映体而不是对映体。尽管目前还不能够获得铁肠杆菌素的合适晶体进行 X 射线衍射研究，在铁处的构象可以通过与铬(Ⅲ)肠杆菌素配合物的构象进行比较推理出来。这个任务是通过研究三(儿茶酚)铬(Ⅲ)完成的。该配合物不易发生取代反应，可以用色谱法分离得到光学异构体。通过将铬(Ⅲ)肠杆菌素的圆二色性谱与三(儿茶酚)铬(Ⅲ)的 Λ 和 Δ 异构体的圆二色性谱比较发现，后一个异构体的谱类似于肠杆菌素配合物的谱(图 5.2)。假设铁(Ⅲ)和铬(Ⅲ)三(儿茶酚)配合物具有类似的结构以及铁(Ⅲ)和铬(Ⅲ)具有相同的色谱性能，可以得出后者具有优势构象为 Δ 异构体。这个结论最近已得到钒(Ⅳ)类似物$[V(肠杆菌素)]^{2-}$的晶体结构分析支持，如图 5.3 所示。

铁肠杆菌素与 *E. Coli* 内外膜上的专一受体相互作用，并且通过能量依赖机理被转移至细胞内，如图 5.4 所示。它的摄取过程可通过利用铁的放射性同位素示踪实验证实。$[Fe(ent)]^{3-}$摄取的动力学研究揭示其饱和行为类似于大多数酶的饱和行为，并且可以依据

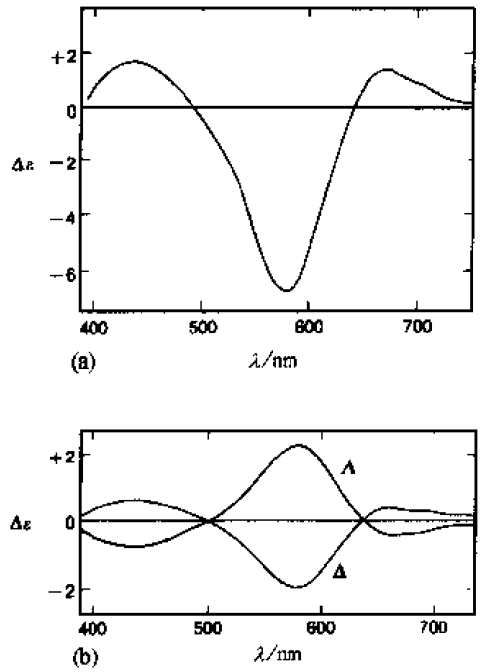


图 5.2　铬(Ⅲ)肠杆菌素的圆二色性谱(a)和三(儿茶酚)铬(Ⅲ)的两个异构体的圆二色性谱(b)

注：Δ 异构体的光谱对应于肠杆菌素衍生物的光谱[摘自 S. S. Isied *et al.*, *Journal of the American Chemical Society* 98, 1763~1769 (1976)]

Michaelis-Menten 模型来解释。对于$[Fe(ent)]^{3-}$，其表观束缚常数(K_m)接近于 0.3 μmol，预示着它能够合理地同某个特定受体紧密地结合在一起。人们利用这种摄取分析方法研究受体所认可的$[Fe(ent)]^{3-}$结构特征，并且使研究铁释放机理的实验更易于进行。例如，简单的儿茶酚配合物如$[Rh(cat)_3]^{3-}$不能抑制$[Fe(ent)]^{3-}$的摄取。铑在这些研究中被使用，因为它能形成动力学上惰性的配合物。然而，通过修饰配体从而结合到肠杆菌素酰胺链所生成的配合物，是非常有力的抑制剂。因此，N，N-二甲基-2，3-二羟基苯甲酰胺合铑能够有效地抑制$[Fe(ent)]^{3-}$在 100 μmol 水平上的摄取。这些观察结果提示，尽管金属儿茶酚胺配合物的三(儿茶酚)阴离子和酰胺部分对于膜受体的识别是必需的，但三内酯环并不十分重要。该结果说

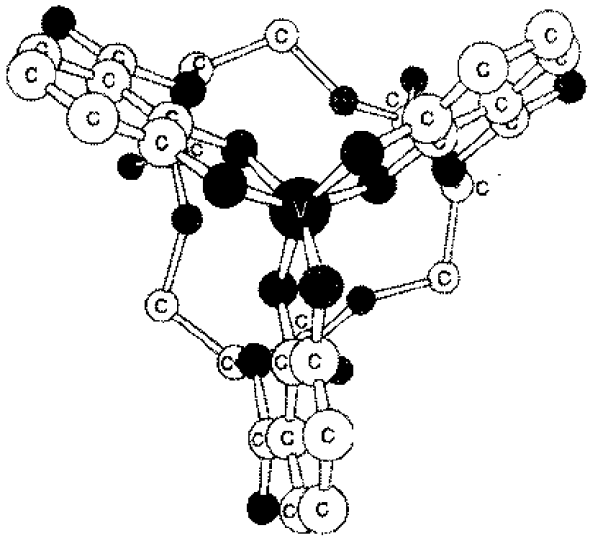


图 5.3　钒(Ⅳ)肠杆菌素的 X 射线晶体结构

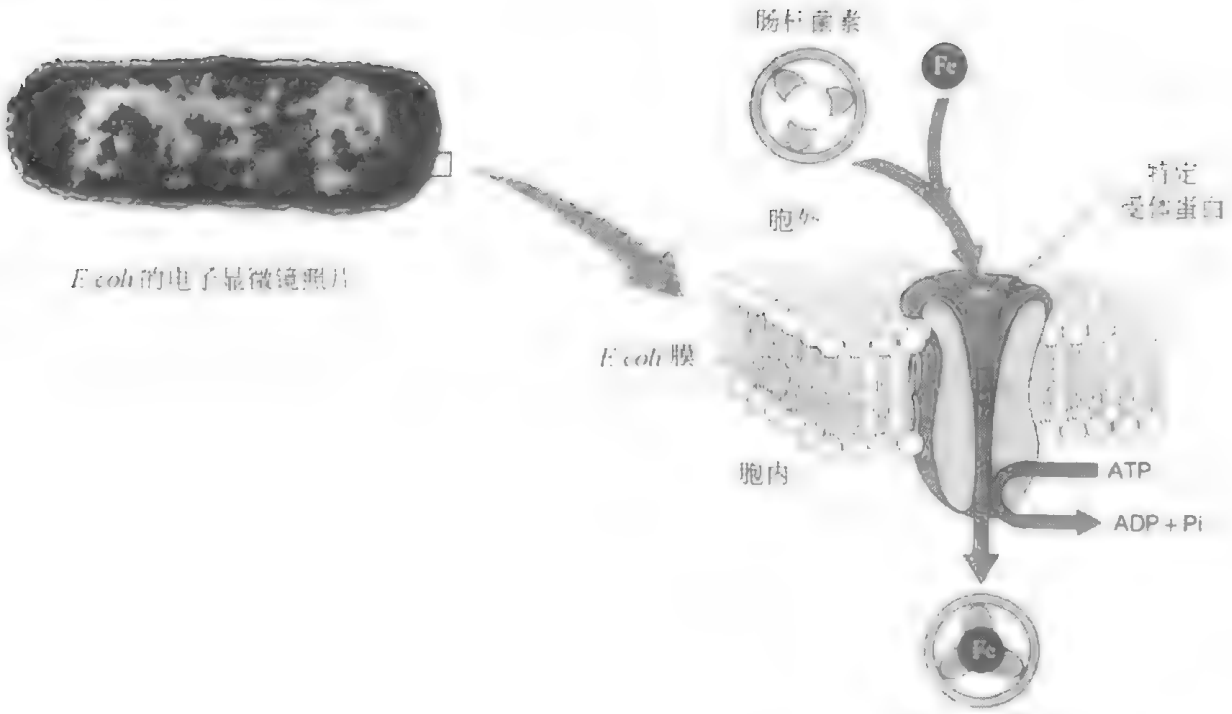


图 5.4　铁肠杆菌素通过细胞膜处的一个特定受体蛋白在 ATP 驱动下被摄取到 *E. Coli* 细胞示意图

明，保留肠杆菌素的二羟基苯甲酰胺基团而不是其余部分的合成类似物对受体具有竞争性。作为对水解不敏感的三内酯官能团肠杆菌素的稳定类似物，合成了一些化合物。其中之一为 MECAM，如图 5.5 所示。其中三内酯部分被一个 1,3,5 三亚甲基苯基所取代。这个配体与铁(Ⅲ)紧密结合的程度几乎与肠杆菌素本身一样($K_f = 10^{46}$)。后来的工作表明，MECAM 的铑配合物实际上是一个摄取 $[Fe(ent)]^{3-}$ 的有效抑制剂。而且这个配体的铁配合物能够被细胞吸收，并且可作为一个铁源。尽管受体本身的特点还未被人们所完全认识，这些结构-活性关系已告诉我们受体-$[Fe(ent)]^{3-}$ 相互作用的许多本质内容。

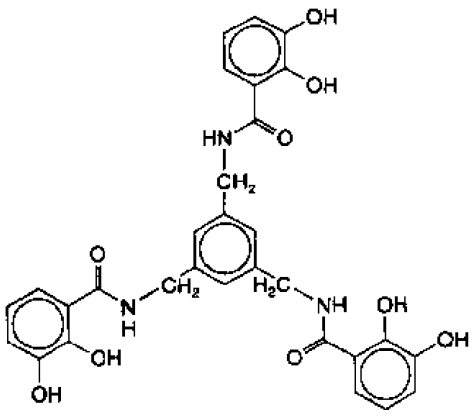


图 5.5　肠杆菌素的合成模型，MECAM 的化学结构

最后，我们来讨论铁释放机理问题。铁(Ⅲ)与肠杆菌素结合的如此紧密以至于独立的释放缓慢到与生物过程无关，人们为此提出了几种可能的机理。首先，肠杆菌素结构的敏感性提示配体水解可用于铁的释放。Fe(Ⅲ)-MECAM 不含任何易水解基团，但它是一个有效的铁源。这表明该配体水解机理不可能是惟一的。第二种可能的机理是铁从铁(Ⅲ)被还原到铁(Ⅰ)，提供了配合物的一个更易变化和较不稳定的形式，该配合物在细胞质内释放铁。在生理 pH 下，三(儿茶酚)铁(Ⅲ)配合物的还原电位估计接近于 −750 mV/NHE。在中性 pH 下，这个很小的负值好像不能发生还原。然而，因为在金属与肠杆菌素结合时，有 6 个质子被释放出来，并且铁肠杆菌素本身在 pK_a 略低于 5 时能够质子化，所

以在较低 pH 时，还原好像是可能的。最后，可能有一种专一细胞内铁结合配体，这种配体结合氧化还原化学，在细胞内将铁从肠杆菌素中分离出来。更进一步的研究对于发现铁释放机理是不可缺少的。关于铁在细胞内的控制和利用的更多信息将在第 6 章中讨论。

5.2 低丰度金属的富集策略和细胞内化学

细胞从它所处的周围环境摄取和富集某一特定金属离子有几种可能的机理。在本章早些时候提到钒的一个特例，海鞘类动物和被囊类动物必须从海水中积聚钒元素。钒元素在海水中几乎全部以 VO_4^{3-} 离子形式存在，这个负离子通过某一特定体系进入细胞，该体系能够经过外细胞膜将阴离子如硫酸根离子等传递。一旦进入细胞内，钒被还原，与细胞内组分结合，并且不再能够扩散到介质中。其他元素也是经过同样的阴离子传递体系接近细胞质的。一个有趣的例子是铬，它以铬酸盐离子 CrO_4^{2-} 形式存在，具有致癌作用。尽管人们还不了解该元素致癌的全部细节，如图 5.6 所示，它进入细胞并且变得稳定的机理最近已被提出来。如同钒酸根离子、铬酸根被阴离子传递体系载入细胞内。在细胞质内，铬酸根与一个细胞内三肽、谷胱甘肽(GSH)反应。谷胱甘肽含有一个半胱氨酸巯基，在细胞内的浓度约为 5 mmol/L。在同 GSH 的反应中，CrO_4^{2-} 被还原为 Cr(Ⅴ)和 Cr(Ⅳ)，并且形成 Cr—S 键。这个金属离子以此方式被捕获到细胞内，如钒的还原态那样，不能够再被扩散到原生质。与 DNA 结合，随后最终被还原为 Cr(Ⅲ)，被认为是这个离子致癌作用的辅助步骤。有趣的是，人们发现，铬在 +2 和 +3 氧化态时是没有致癌作用的，因为它不能很容易地进入细胞。因此，传递的顺利进行是中毒机理的一个十分重要方面。

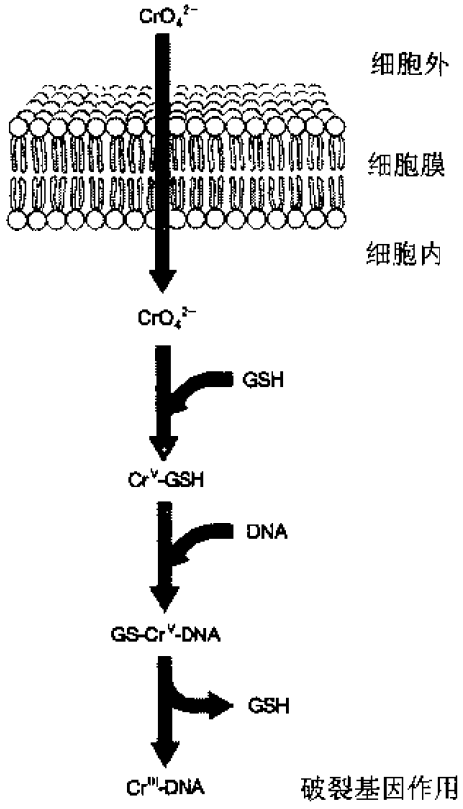


图 5.6 铬酸根离子的细胞摄取和基因中毒作用模型

CrO_4^{2-} 离子通过特定通道进入细胞，被谷胱甘肽(GSH)还原，并且与 DNA 以共价键相结合

对于中性金属配合物，细胞内摄取是经过穿越细胞膜的被动扩散过程进行的。这个机理适用于在第1章所简要提到的抗癌药物 顺-二氯二氨合铂(*cis*-DDP)或顺铂。顺铂是作为盐水溶液静脉注射到体内的。将近一半的铂与血清蛋白结合并被排出体外，其余的则分布在不同的组织内。在血清中，由于相对较高的氯离子浓度(≈0.1 mol/L)，该药物中的大部分以 *cis*-$[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ 形式存在。作为一种中性分子，顺铂主动穿过细胞膜扩散到细胞质，在此遇到浓度很低的氯离子(≈3 mmol/L)。水解产生的阳离子配合物，如 *cis*-$[Pt(NH_3)_2(OH_2)Cl]^+$ 扩散到 DNA，一种多聚阴离子，在那里它们结合在一起，导致细胞毒性损伤。*cis*-DDP 的水解反应是它的生物学活性的重要方面。如图 5.7 所示，氯离子逐步被取代，形成水合物和羟基化

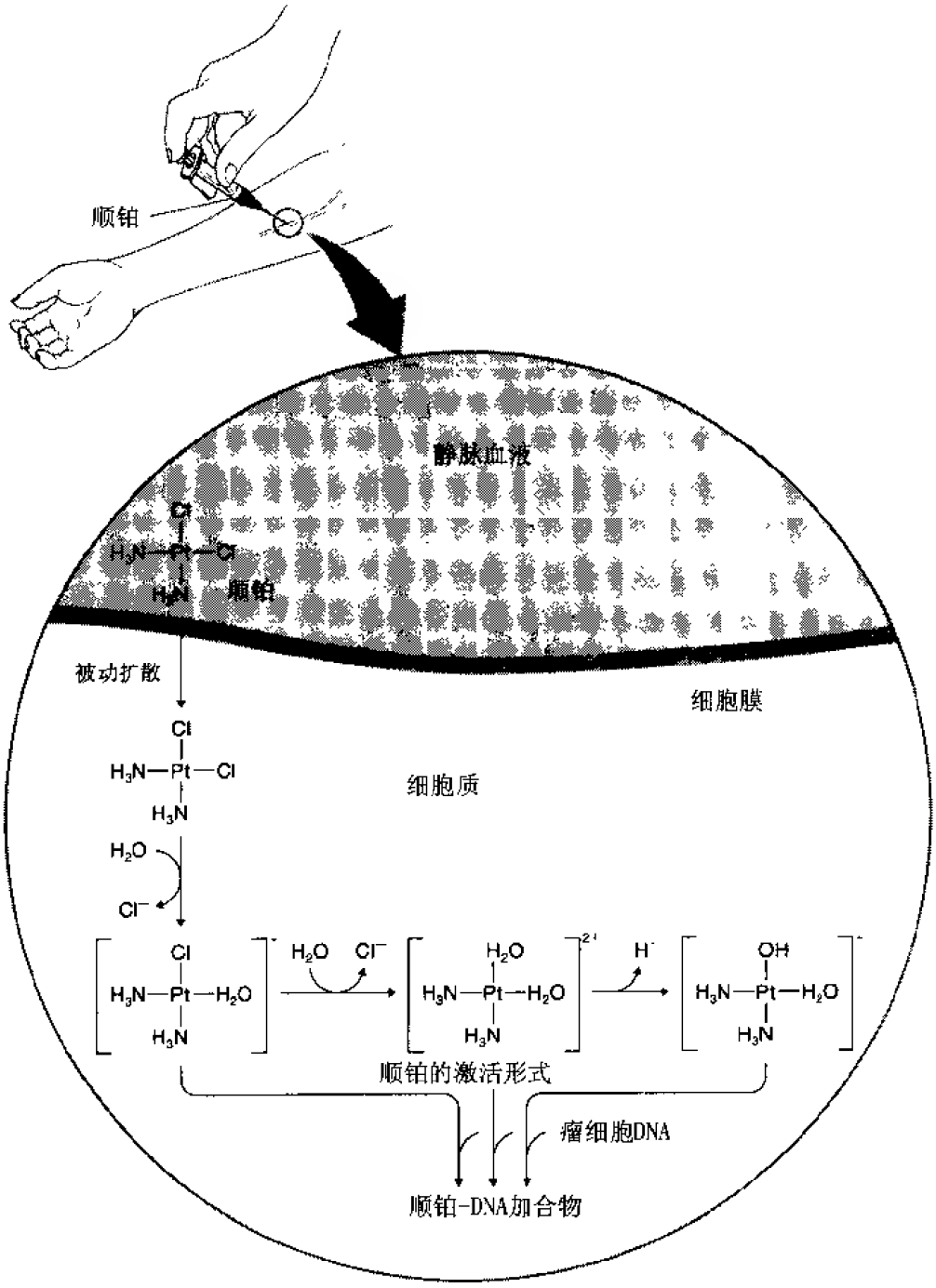


图 5.7　抗癌药物顺铂的引入和体内化学

合物。该药物的这些水解形式较 *cis*-DDP 更容易与 DNA 反应。*cis*-DDP 配合物与小牛胸腺 DNA 结合速率的研究表明，DNA 结合的动力学相同于第一个氯离子从铂配位界中水解的动力学。*cis*-和 *trans*-DDP 与 40 个来自于小鸡红细胞 DNA 的碱基碎片结合的 $^{195}Pt(I=1/2)$ NMR 研究表明，铂首先反应形成单功能加合物，在此，只有一个键结合到核酸分子上。它们再慢慢地靠近，从而结合成双功能加合物，在此有两个铂-核酸键。这两个化学过程发生的半衰期均为 2～3 小时，失去氯离子的步骤是速率决定步骤。这里重要的是，通过改变它的化学形式，部分中性分子变为正离子，药物被摄取到细胞内。在此药物能够破坏细胞的基因组，并表现出抗癌活性。该机理这方面的内容在本质上与前面所讨论的低丰度金属 V 和 Cr 的机理相同。

尽管与 DNA 结合通常被认为是顺铂抗癌机理的一个必要步骤，*cis*-DDP 水解产物也同细胞内其他组分相互作用。对于铬来说，这样的一个反应例子是与谷胱甘肽的作用。依据软硬酸碱理论(2.1.a)，谷胱甘肽非常容易与顺铂及其他的水解产物结合。这个化学过程大概能够改善该药物的毒副作用而不影响其抗癌活性，并与 *cis*-$\{Pt(NH_3)_2\}^{2+}$/DNA 加合物的形成和存在相互联系。另一个认为与铂抗癌药物反应的分子内组分是抗坏血酸，它能够将 Pt(Ⅳ)还原到 Pt(Ⅱ)。这个化学过程在口服新型 Pt(Ⅳ)抗癌化合物的活化作用中是重要的，该类化合物最近已经进入临床实验阶段。这类反应是生物无机化学工作者的重要研究课题。

5.3 金属簇的自发自组装

许多金属在蛋白质和核酸中与其结合部位以简单离子的形式配位。因此，Zn^{2+} 与羧肽酶以及与锌指域结合，铜以 Cu^{+} 或 Cu^{2+} 与质体蓝素结合等等。然而，有时需要一个较为复杂的含金属单元。这里将要描述两个这样的例子，阐述自然界是如何应用无机簇合物化学来完成金属蛋白中的特殊作用的。尽管人们还不了解这些簇合物在体内是如何装配和插入到蛋白质中的，但是，正如在第 2 章所描述的现代化合物的合成那样，这些过程可能包含自发自组装。

5.3.a 铁-硫簇合物

在生物无机化学中，铁-硫簇作为电子传递蛋白质的必要组分的发现是很有趣的一部分内容。这些簇合物的化学特征和命名法被列在表 5.2 中。尽管 *n*Fe-*n*S 簇存在的最终证据来自蛋白质的 X 射线晶体结构测定，这些簇的高分辨度量参数数值，特别是它们总的电荷数有时主要依据复制模型配合物的合成与表征。而且，一旦主要簇合物组成被确定，电子吸收，EPR，和穆斯鲍尔谱的应用能够使不同核酸被很快和准确地鉴定，而不需要借助于蛋白质的 X 射线晶体结构测定。而且，X 射线晶体结构测定经常需要多年才能完成。最后，有几种已知结构不仅在生物学而且在无机化学中都是无前例的，这要归功于人们期待遇到新结果的热情，并且向现代合成化学工作者提出了更为重要的挑战。在此，我们将描述基本结构类型、蛋白质簇合物上的电荷、以及物理性质。现代合成工作将在随后部分单独讨论。

(i) [1Fe-0S]。图 5.8 给出了来自于 *C. pasteurianum* 红氧还蛋白(Rb)的晶体结构分析结果。这个蛋白质包含有一个被 4 个半胱氨酸硫原子配位的四面体单铁原子，Fe—S 平均键长为 2.29(2) Å(回顾在 4.3.b 节中的讨论)。蛋白质链上的半胱氨酸配体成对存在。—Cys(6)—X—X—Cys(9)—Gly 和 Cys(39)—X—X—Cys(42)—Gly，这里—X—代表一个插入的氨基酸。尽管结晶学不能够给出在蛋白质中$\{Fe(SR)_4\}^{n-}$所带有的总体电荷，但 EPR 和穆斯鲍尔谱(表 5.2)清楚地表明铁是高自旋+3 价铁。Rb 氧化态的红色来自于在 490 nm 处

表 5.2　铁-硫蛋白的典型化学和光谱特性

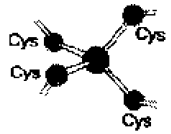
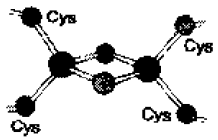
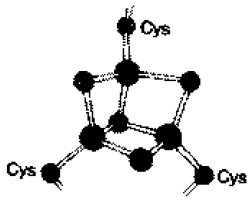
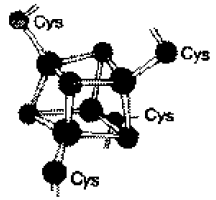
蛋白	簇合物		氧化状态	表观价态	EPR g 值(温度)	穆斯鲍尔异构位移 mm/s	λ/nm 消光系数$\times 10^{-3}$/Fe
红氧还蛋白	1Fe-0S		氧化态	Fe^{3+}	4.3,9 (<20 K)	0.25	390(10.8),490(8.8)
			还原态	Fe^{2+}	无	0.65	310(10.8),335(6.3)
2-铁铁氧还蛋白	2Fe-2S		氧化态	$2Fe^{3+}$	无	0.26	325(6.4),420(4.8),465(4.9)
			还原态	$1Fe^{3+},1Fe^{2+}$	1.89,1.95,2.05 (<100 K)	0.25,0.55	还原时吸收减少 50%
3-铁铁氧还蛋白	3Fe-4S		氧化态	$3Fe^{3+}$	1.97,2.00,2.02 (<20 K)	0.27	305(7.7),415(5.2),455(4.4)
			还原态	$2Fe^{3+},1Fe^{2+}$	无	0.30,0.46	425(3.2)
4-铁铁氧还蛋白	4Fe-4S		氧化态	$3Fe^{3+},1Fe^{2+}$	2.04,2.04,2.12 (<100 K)	0.31	325(8.1),385(5.0),450(4.6)
			中间态	$2Fe^{3+},2Fe^{2+}$	无	0.42	305(4.9),390(3.8)
			还原态	$1Fe^{3+},3Fe^{2+}$	1.88,1.92,2.06 (<20 K)	0.57	还原时吸收减少(无特征)

图 5.8　来自 *C. Pasteurianum* 的红氧还蛋白的铁核几何结构

的一个 S→Fe 电荷转移带。在 pH 为 7 时，几个红氧还蛋白的测定氧化还原电位处于－50～＋50 mV之间。

(ii) [2Fe-2S]。来自于 *S. platensis* 的一个[2Fe-2S]铁氧还蛋白(Fd)的 X 射线结构表明 $\{Fe_2S_2(S\text{-}Cys)_4\}^{2-}$ 簇的存在，在该簇中两个硫配体将两个四面体配位铁原子(图 5.9)联系在一起。这个双桥联 Fe_2S_2 单体中，Fe…Fe 间距为2.7 Å。在一个四面体硫环境中，铁的氧化状态很容易达到＋2 和＋3。原则上，在 $\{Fe_2S_2\}^{n+}$ 核上的电荷可从 0($Fe^{II}Fe^{II}$)变化到＋1($Fe^{II}Fe^{III}$混合价态)，再到＋2($Fe^{III}Fe^{III}$)。后两种状态存在于蛋白质中，并且依据它们的物理性质(表 5.2)很容易分辨。事实上，这些[2Fe-2S]蛋白类的铁-硫核结构，在依据蛋白质结晶学证实之前是从它们的物理化学数据推理出来的。

因为铁中心是四配位的，所以晶体场分裂是微弱的，并且金属无论是在氧化态还是在还原态都是高自旋的。但是，桥硫原子的存在提供了一个抗铁磁交换偶合途径，以致蛋白质的氧化型二铁(Ⅲ)的基态是抗磁性的(S_T－ 0)。[2Fe-2S]铁氧还蛋白的顺磁混合价形式 $Fe^{II}Fe^{III}$ 在首次被发现时，是非常有趣的。铁核(^{57}Fe)和桥硫原子(^{33}S，以及在锡取代物 Fd 中的 ^{77}Se)的超精细偶合使得整个簇产生电子离域效应。低于 2.00 (表 5.2)g 值的存在最终可用交换-偶合模型解释。因此，这些特征 g 值将是鉴别混合价抗铁磁偶合 Fe(Ⅲ)Fe(Ⅱ)中心的重要依据。从穆斯鲍尔谱可以清楚地看出[2Fe-2S]蛋白氧化型的谱是由一个四极二重态高自旋铁(Ⅲ)组成，还原型的 Fe(Ⅲ)和 Fe(Ⅱ)有两个清楚的四极二重态，处于捕获价形式。换句化说，在穆斯鲍尔谱时间标度上，电子交换的速率是很慢的(见表 4.1)。

(iii) [3Fe-4S]。来自于 *A. vinelandii* 的 7-铁铁氧还蛋白的 X 射线晶体结构，最初被认为含有一个[4Fe-4S]和一个[3Fe-3S] 簇。后者被报道含有一个近似于平面的六元 Fe_3S_3 环

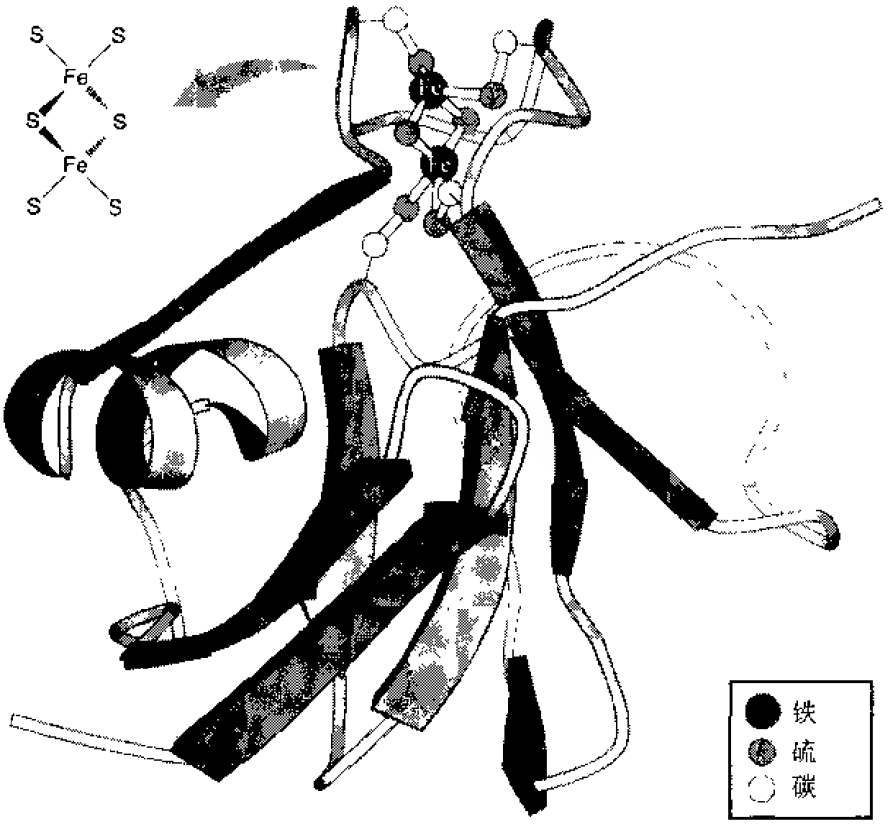


图 5.9　*S. platensis* 铁氧还蛋白和它的 2Fe-2S 簇的结构

(图5.10),并且这样的结构不仅在铁-硫蛋白质中而且在小分子的铁-硫配合物中都是独特的。正如最近两个研究小组,包括最初的研究者指出的那样,最初报道的结构总的说来是错误的,这是因为错误地选择了在对映体 $P4_12_12$ 和 $P4_32_12$ 之间的一个空间基团。修饰后的结构具有一个折叠链,非常类似于后面将要讨论的 8Fe-8S 铁氧还蛋白的结构,而这个特征在最初的分析中被完全忽略掉。另一个重要的变化是三铁簇,如$[Fe_3S_4]$的再分配,该簇具有图 5.10 所示的几何结构。

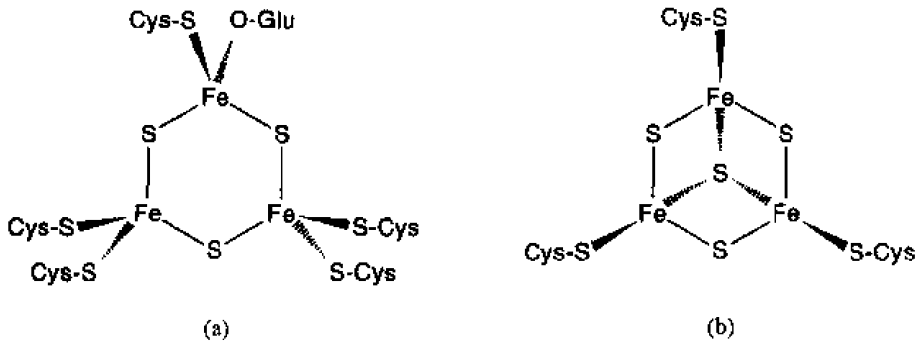


图 5.10　*A. vinelandii* 铁氧还蛋白中[3Fe-4S]簇合物最初报道的平面形(a)和修正过的非平面形(b)

这个非平面结构可以通过从[4Fe-4S]核的立方体的 8 个角之一(见后面部分)去掉一个 Fe-S(半胱氨酸)单位推理出来,其正式转化过程如式 5.2 所示。有关 *A. vinelandii* Fd,来自于 *Desulfovibrio gigas* 的 3Fe-4S Fd 以及鸟头酸酶钝化状态的 EXAFS 数据都支持了同一个[3Fe-4S]簇的存在。如式 5.2 所预测的那样,在 *A. vinelandii* Fd 中,3 个半胱氨酸巯基将该簇与蛋白质链固定在一起。

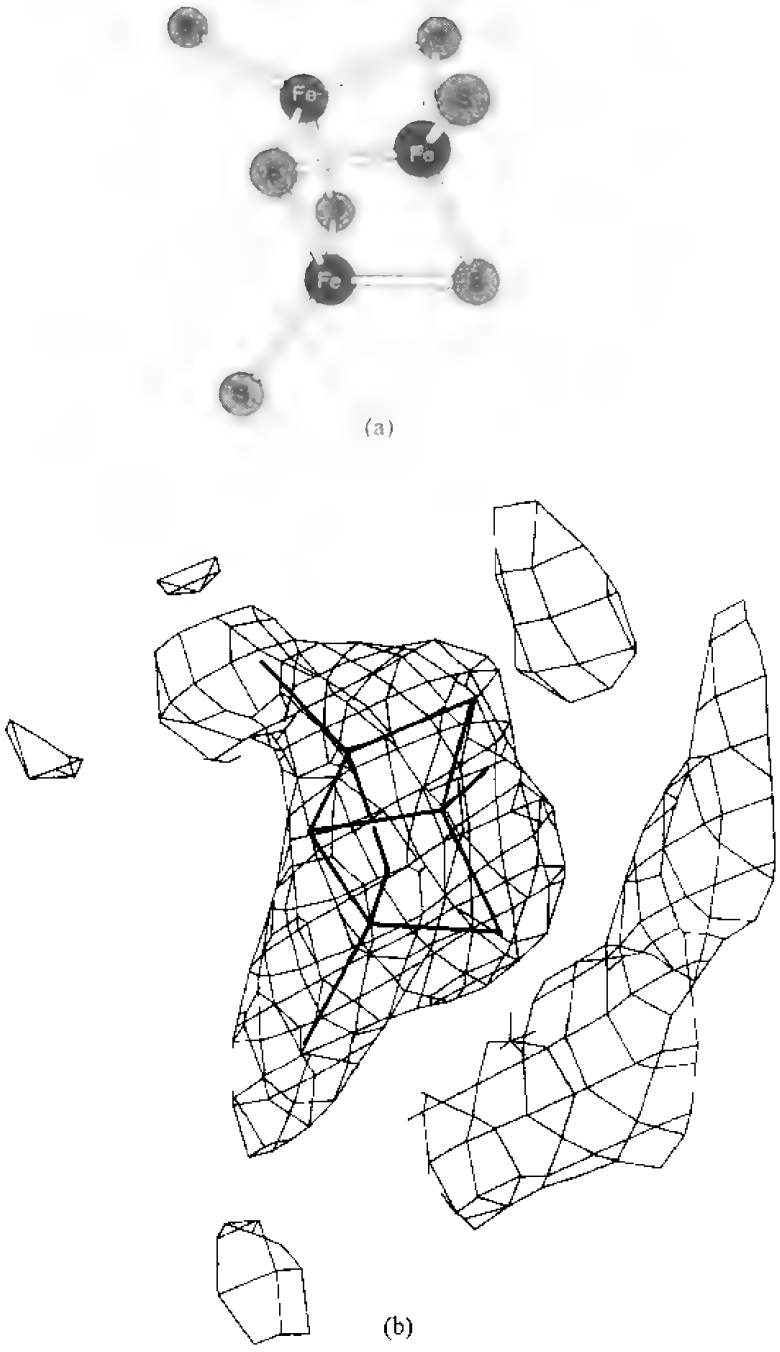
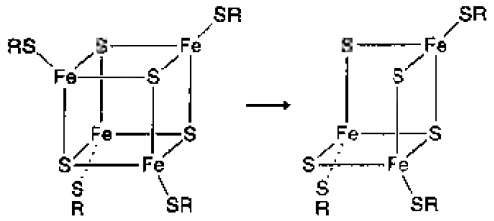


图 5.11　在 *A. vinelandii* 铁氧还蛋白中的 3Fe-4S 簇合物(a)和在(a)的基础上分辨率为 2.7 Å 的电子云密度图(b)

摘自 C. D. Stout, *Journal of Biological Chemistry* 263, 9256～9260(1988)



(5.2)

在 *A. vinelandii* 中，[3Fe-4S]簇正确鉴定的历史过程在教学上引起了人们的兴趣。*D. gigas* Fd 以及乌头酸酶的 3Fe 形式的穆斯鲍尔谱和 EXAFS 谱研究揭示了两个不同的铁部位，比率为 2∶1，Fe…Fe 间距为 2.7 Å。这两个数据都与最初报道的 *A. vinelandii* Fd 结构不同。最初报道的结构有 3 个等价铁部位，Fe…Fe 间距为 4.1 Å。而且向小牛心乌头酸酶中加入二价铁而不加入无机硫化物可以提高酶的活性。这个结果以及仔细测量蛋白质中无机硫化物的含量所得出的化学计量为[3Fe-4S]，与最初晶体结构分析所得结果[3Fe-3S]不同。因此，要么自然界中含有两种不同类型的 3Fe 簇，要么其中的一种结构测定是错误的。这个例子给生物无机化学学生上的一课是，蛋白质的晶体结构不像小分子 X 射线结构那样准确可信。即使在空间基团的分配上没有发生错误，从蛋白质的晶体数据所推理的电子密度图至少带有部分主观性。图 5.11 说明了这个观点，展示了在 *A. vinelandii* Fd 中[3Fe-4S]簇附近真实电子云密度的立体观察，分辨率为2.7 Å。对蛋白质晶体结构测定不熟悉的读者不能够识别图5.10中簇合物的几何模型与图 5.11 中电子云密度的关系。而且，并不是蛋白质晶体学家总能解释电子密度图。对光谱和机理有兴趣而对晶体结构测定不太熟悉的研究者同样应该谨慎。

表 5.2 列出了[3Fe-4S]蛋白质的物理数据。从该表可以看出这个簇具有特定的光谱特征。除 *D. gigas* 是惟一不含有第二个 Fe_nS_n 单位的蛋白质外，[3Fe-4S]簇光谱参数的获得是一个重要的进展。较大的困难是如何获得同时包含有 3Fe 和 4Fe 蛋白如 *A. vinelandii* 和 *A. chroococcum*铁氧还蛋白(Fd Ⅰ)的氧化还原电位数据。能够确切知道关于后者的信息，对于这些蛋白质作为电子传递剂的了解是十分重要的。

(iv) [4Fe-4S]。生物学中最普遍存在的铁-硫簇就属于这一类。其基本结构是一个变形的立方体，Fe 原子和 S 原子交替地出现在立方体角处。此结果是 4 个铁原子和 4 个硫原子的 2 个互相穿插的同心四面体，Fe…Fe 和 S…S 间距分别约为 2.75 Å 和 3.55 Å(图 5.12)。这个四面体被 4 个半胱氨酸的硫原子在 4 个铁原子角处固定在蛋白质上，产生一个变型的四面体配位几何结构(图 5.13)。这些[4Fe-4S]簇的蛋白质 X 射线结构结果对于来自于 *Chromatium A* 的 HiPIP 的氧化和还原态都是适用的。该结果也适用于 *A. vinelandii* 铁氧还蛋白Ⅰ，即前面所讨论的 7Fe/8S 蛋白以及 *P. aerogenes* 铁氧还蛋白，它是一个包含有 2 个不同$\{Fe_4S_4\}^{2+}$簇的8Fe/8S蛋白。在 *P. aerogenes* Fd 中，结合于 2 个[4Fe-4S]中心的 8 个半胱氨酸残基的顺序的位置与它们与这两个簇配位的关系是令人感兴趣的。正如从图 3.6 可以看到的以及在第 3 章已讨论的那样，其排列顺序为

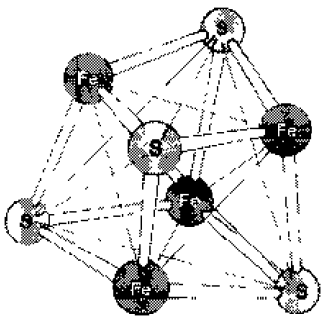


图 5.12 一个 4Fe-4S 簇的变形立方体结构

这个立方体可以设想为两个互相穿插的 Fe_4 和 S_4 四面体

—X—Cys(8)—X—X—Cys(11)—X—X—Cys(14)—X—X—X—Cys(18)—…—X

—Cys(35)—X—X—Cys(38)—X—X—Cys(41)—X—X—X——Cys(45)—…

尽管 8 个半胱氨酸分为二簇，每 4 个一簇，但是 4 个半胱氨酸中只有 3 个结合到[4Fe-4S]单位上，对应于 Cys—X—X—Cys 而不是 Cys—X—X—X—Cys。这种优势选择可以用肽骨架上酰胺氢原子与铁-硫簇上的硫原子形成 NH…S 氢键来解释。最后，近来固氮酶 MoFe 蛋白的晶体结构测定表明，2 个 4Fe-4S 立方体可以通过一个 S—S 键直接连一起。

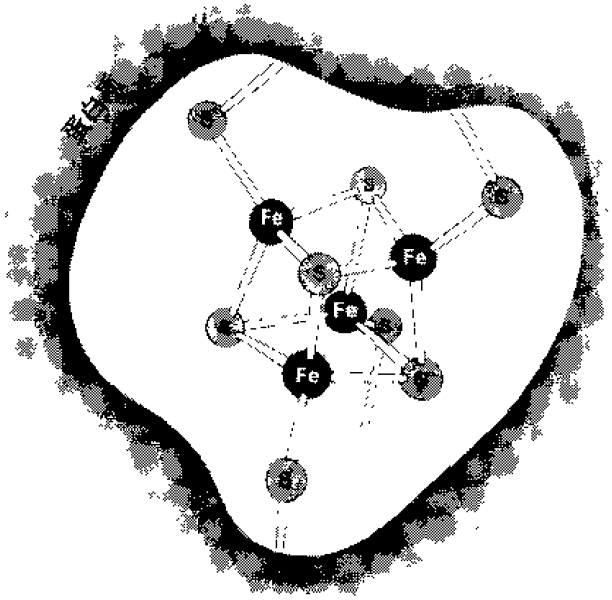


图 5.13　通过 4 个半胱氨酸巯基残基结合到蛋白质上的一个[4Fe-4S]簇

(v) 铁-硫蛋白的合成模型。铁-硫蛋白内的漂亮核心结构向对制备复制模型感兴趣的生物无机化学家提出了一个非常难以克服的挑战。因为尽管 4Fe-4S 立方体在金属有机化学界早已被人所知，但是由于氧化还原(式 5.3)或聚合(式 5.4)反应易于发生：

$$2Fe^{3+} + 2RS^- \longrightarrow 2Fe^{2+} + RSSR \tag{5.3}$$

$$nFe^{2+} + 2nRS^- \longrightarrow [Fe(SR)_2]_n \tag{5.4}$$

通过配位环戊二烯阴离子，制备稳定的硫醇盐配体的铁配合物立方体是十分困难的。一个重大的突破是发现 $FeCl_3$、NaHS 与 3 当量的 $Na(SCH_2Ph)$ 在甲醇中反应，生成 $[Fe_4S_4(SCH_2Ph)_4]^{2-}$ 簇(式 5.5)：

$$4FeCl_3 + 12RS^- \longrightarrow 4Fe(SR)_3 + 12Cl^- \xrightarrow[4HS^-]{4OMe^-} {}^-Fe_4S_4(SR)_4]^2 + RSSR + 6RS^- + 4MeOH \tag{5.5}$$

在这个反应中，一些巯基配体将铁还原成 +2 价氧化态而消耗掉。铁的 +2 价氧化态是 $\{4Fe\text{-}4S\}^{+2}$ 单位所必需的。随后的研究工作发现在足够硫醇盐存在下，元素硫能够作为还原剂代替硫化合物(式 5.6)：

$$4FeCl_3 + 14RS^- - 4S \longrightarrow [Fe_4S_4(SR)_4]^{2-} + 5RSSR + 12Cl^- \tag{5.6}$$

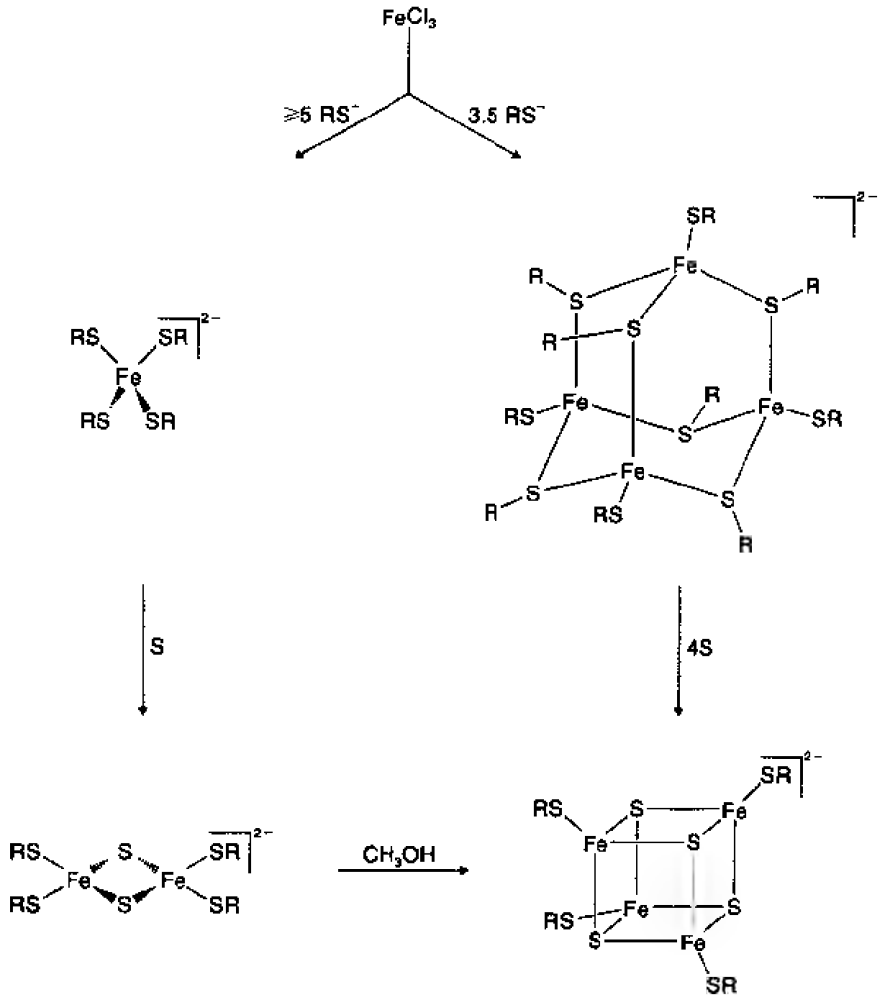


图 5.14　蛋白质中铁-硫簇模型的合成途径

在制备了第一个四核簇合物之后，人们很快发现了[2Fe-2S]簇的合成路线，以及单核红氧还蛋白模型的制备和定性。图 5.14 形象化地总结了这些配合物与某些已鉴定了的中间体的组装过程。

(vi) **簇合物化学和核心挤出**(core extrusion)。从铁-硫模型配合物的化学反应的研究中，人们发现了进一步探索蛋白质中类似簇合物特性的研究方法。一个被证明具有实际意义的反应是配体取代反应，如式 5.7 和 5.8 中末端硫基被逐步取代：

$$[Fe_4S_4(SR)_4]^{2-} + nR'SH \rightleftharpoons [Fe_4S_4(SR)_{4-n}(SR')_n]^{2-} + nRSH \tag{5.7}$$

$$[Fe_2S_2(SR)_4]^{2-} + 4R'SH \rightleftharpoons [Fe_2S_2(SR')_4]^{2-} + 4RSH \tag{5.8}$$

例如，在提高这些反应速率方面，芳基硫醇 PhSH 较脂肪硫醇更为有效，这是因为后者的酸性较弱。从这类蛋白质中所包含的平行反应的化学知识可知，蛋白质中[nFe-nS]，$n=2$ 或 4，簇合物能够整体地从多肽链上分离出来。这些反应被定义为核心挤出反应。对于鉴别前面没有定性的核蛋白质中铁-硫簇的类型，核心挤出反应具有重要的价值。这些反应通常发生在伸展(unfolding)溶剂，如DMSO-H_2O(80% v/v) 中。该溶剂使蛋白质变性，足以使取代反应发生(式 5.9)：

$$\underset{\text{(holoprotein)}}{\text{全蛋白}} + \underset{\text{过量}}{\text{RSH}} \xrightarrow{\text{伸展溶剂}} [Fe_nS_n(SR)_n]^{2-} + \underset{n=2\text{ 或 }4}{\text{脱辅基蛋白}} \qquad (5.9)$$

核心挤出反应已被成功地应用于鉴定 *C. pasteurianum* 氢化酶和固氮酶铁蛋白中的[4Fe-4S]簇，以及 *A. vinelandii* 和牛奶黄嘌呤氧化酶 Fd Ⅱ中的[2Fe-2S]簇。尽管在某些硫醇存在下，2Fe 和 4Fe 簇能够相互转化，充分细心控制实验操作通常可以避免这些潜在的误导反应。然而，一个著名的例外是[2Fe-2S]簇从[3Fe-4F]蛋白中的挤压。如式 5.8 所示，当使用氟代硫醇(HSR_F)，如对 三氟甲基硫酚时，可以通过其特征吸收光谱(表 5.2)甚至 ^{19}F NMR谱，将这个被核心挤出的簇鉴定出来。后法使用效果很好，因为$[Fe_2S_2(SR_F)_4]^{2-}$和$[Fe_4S_4(SR_F)_4]^{2-}$簇具有不同的顺磁接触位移。

5.3.b 多铁氧合簇和生物矿化作用

含有双核铁氧核$\{Fe_2O\}^{2+}$以及相关单元的蛋白质的发现是生物无机化学中的一个新进展。在与双核铁氧合核$\{Fe_2O\}^{2+}$相关的单元中，发现氢氧化物或另外一个单原子桥联配体将两个铁原子连接起来。这种类型的化合物在 Fe(Ⅲ)的水解化学中已被人们所熟知，并且在 Fe(Ⅱ)化合物被氧化时可以形成。典型的反应如方程 5.10 和 5.11 所示：

$$2Fe^{3+} + 6OH^- \longrightarrow Fe_2O_3 \cdot 3H_2O \qquad (5.10)$$

$$12Fe^{2+} + 3O_2 + 12H_2O \longrightarrow 6Fe_2O_3 + 24H^+ \qquad (5.11)$$

在金属蛋白如蚯蚓血红蛋白(Hr)和核苷酸还原酶(RR)中，μ-氧合二铁(Ⅲ)部分是由 1 个或 2 个附加桥羧基相联系的。羧基将铁原子相互拉得很近，并且使 Fe—O—Fe 桥角弯曲到≈120～130°。在这些蛋白质中发现的 μ-氧合二(μ-羧基)二铁(Ⅲ)在无机化学中已有先例，一个多世纪前已被发现其存在于碱式碳酸铁中。这些配合物具有通式$[Fe_3O(O_2CR)_6L_3]^+$，其中，1 个三重桥氧原子与等边三角形角上的 3 个铁(Ⅲ)离子相连，2 个羧基配体将三角形每个边上的铁原子对连接在一起，形成存在于蚯蚓血红蛋白中的$\{Fe_2O(O_2CR)_2\}^{2+}$单元。Hr、RR 以及碱式碳酸盐的核心结构描绘于图 5.15。

在生物体中多铁氧合簇存在的另一个更为显著的例子为铁贮存蛋白铁蛋白。哺乳动物铁蛋白是由 24 个亚基的蛋白质壳体组成的。这些亚基环绕着含有不同数量磷酸盐水合铁氧化物的一个核。每个蛋白质亚基由约 175 个氨基酸组成。每个脱铁蛋白可接纳 4500 个铁原子，给出大约每个氨基酸一个铁原子的比率。正如脱铁蛋白的 X 射线晶体结构测定所揭示的那样，蛋白质的整体结构是高度对称的(图 5.16)。在这个结构中不对称的单元是一个多肽链；结晶空间基团的对称性产生全二十四肽组装，该组装具有立方 432(有时称为 O)点群对称。这个结构大体上是球形的，外径为 130 Å，内径为 75 Å。连接组合体内侧与外侧的通道沿着三折叠和四折叠轴线。四折叠通道排列有疏水残基，而三折叠通道排列有亲水性的天冬氨酸盐和谷氨酸盐的残基。这些三折叠通道表现出是金属进入的最可靠的部位。蛋白质壳体内侧也排列有亲水残基。

铁蛋白的铁核心结构已通过多种光谱技术进行研究。这些技术包括 EXAFS、穆斯鲍尔谱和分光法。研究所得结果符合八面体配位 Fe(Ⅱ)离子结构，这些铁(Ⅱ)离子是由桥式氧化物和(或)桥式氢氧离子相连接在一起的。EXAFS 光谱测得 Fe-O 间距为 1.95 Å，Fe-Fe 间距为 3.3 Å，在这个距离内聚集了大约 7 个铁原子。符合这些计量参数的结构是由氧原子与铁原子

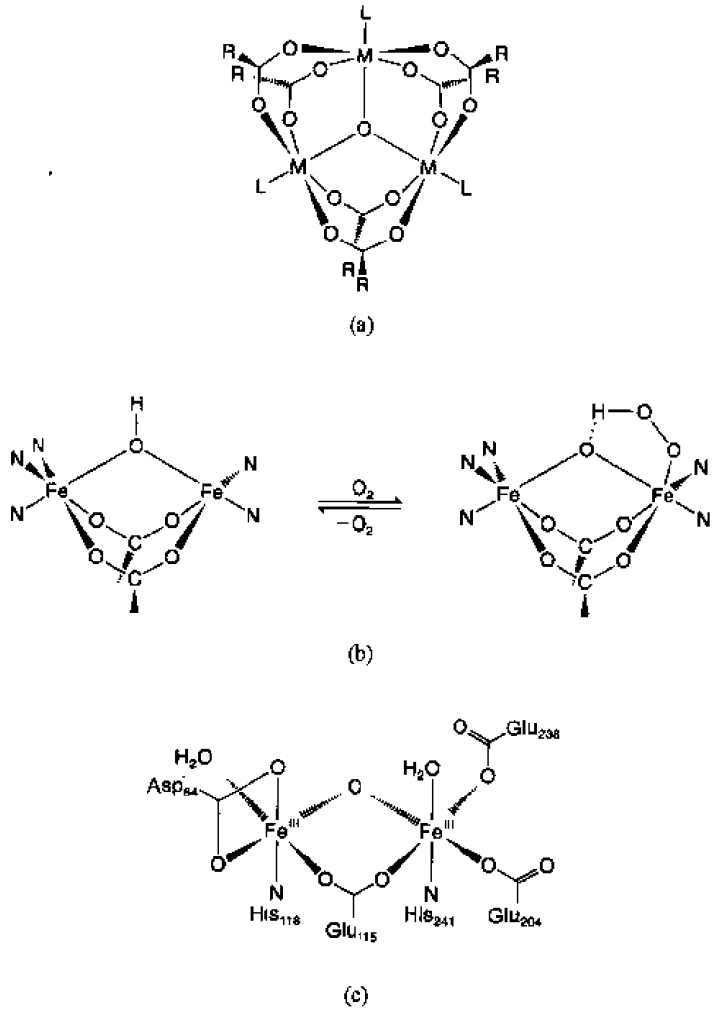


图 5.15　自然界中发现的多铁碳酸盐结构

(a)生物学界未知的碱式金属碳酸盐;(b)蚯蚓血红蛋白中桥式碳酸盐二铁单元的 O_2-结合反应;
(c)核苷酸还原酶的氧化 R2 蛋白中的桥式-碳酸盐二铁单元

部分处于八面体空隙的紧密堆积排列组成的。空的八面体部位的排列可能是无规则的,也可能是按层排列的。因此这个结构可以被描绘为由相互连接的 FeO_6 单元组成的二维平面,这些平面自身折叠充满三维核。一种被称为氢化铁(ferrihydrite)的矿物质具有类似的假定结构。氢化铁(ferrihydrite)所呈现的 X 射线衍射图类似于孤立铁蛋白分子引起的电子衍射图。这些衍射图不能提供彻底确定结构所需要的足够信息,还需要更进一步的工作来确定核心几何形状以及铁进出的机理。

铁蛋白核的形成是生物矿化过程的一个例子。生物体为了多种目的从简单化合物合成矿物质,一些例子包括提高骨骼强度的磷酸钙矿物质,以及磁性细菌定向的磁铁矿(Fe_3O_4)粒子。铁蛋白核组装机理的有关信息已通过直接研究和考察模型体系而获得。这个途径可能包括 Fe(Ⅱ)进入到亲水通道或内部边缘,随后被空气氧化为 Fe(Ⅲ)而产生几个初始配合物。这些配合物伴随 Fe(Ⅱ)的水解聚合作用以及氧化成 Fe(Ⅲ)产生核心而增多。式 5.10 和 5.11 所示

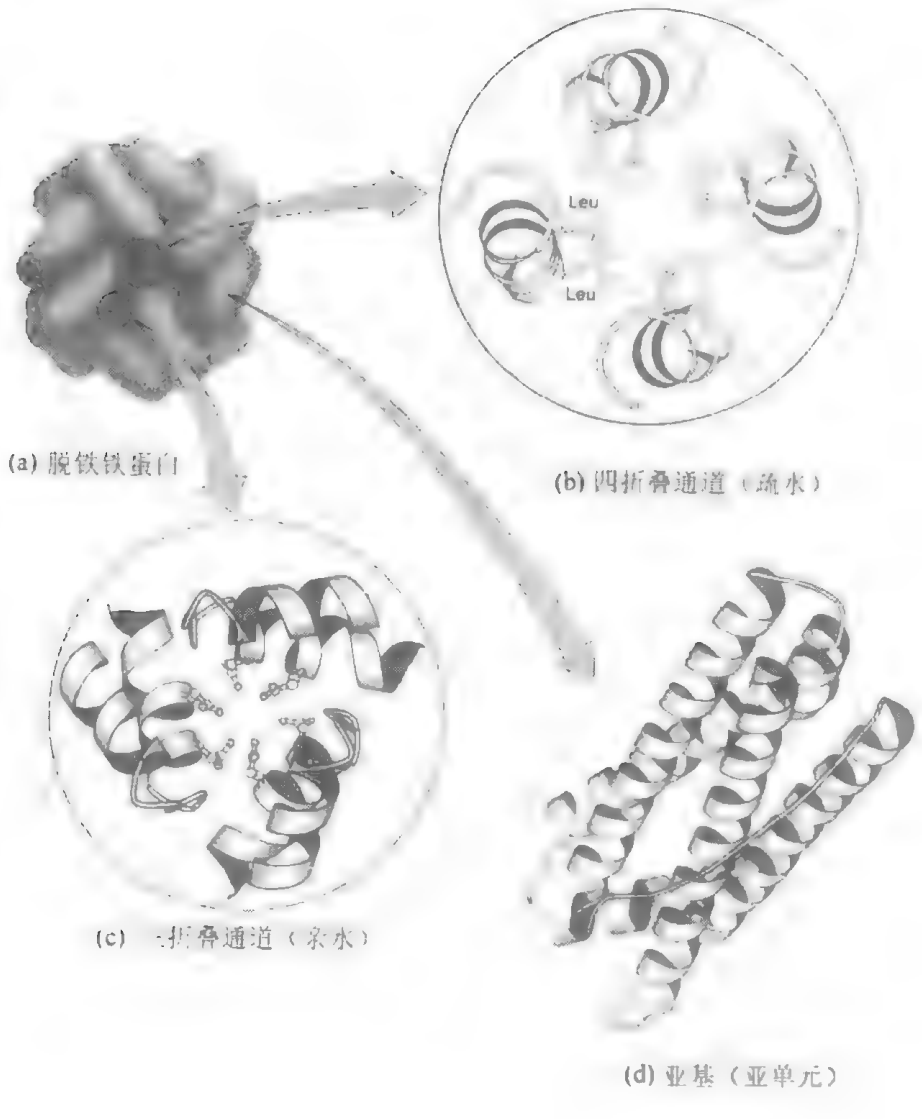


图 5.16　铁贮存蛋白铁蛋白的结构特征

(a)在脱铁蛋白中 24 个亚基的整体组织；(b)四折叠对称的疏水通道；
(c)三折叠对称的亲水通道；(d)单个亚基的折叠

的无机反应似乎参与此过程。

在适当配体存在下于含水或非水溶剂中，对 Fe(Ⅲ)配合物水解产物的控制进行了研究。含有二核、三核、四核以及甚至十核、十一核、十二核、十七核和十八核 Fe(Ⅲ)核心结构的许多配合物已经被合成出来，并且也已得到了表征。

图 5.17 所示的结构为一个最近被表征的配合物：

$$[Fe_4^{\blacksquare}Fe_8^{\blacksquare}(O)_2(OCH_3)_{18}(O_2CCH_3)_6(CH_3OH)_{4.67}]$$

这个化合物是通过向含有醋酸亚铁和甲氧基锂的甲醇溶液中慢慢通入氧气而制备的。它具有一个变型的氯化钠结构，并且类似于假设铁蛋白中铁和氧原子的三维点阵结构。毫无疑问，这类配合物的进一步表征将对阐明铁蛋白核心结构的细节以及其组装和分解途径提供线索。

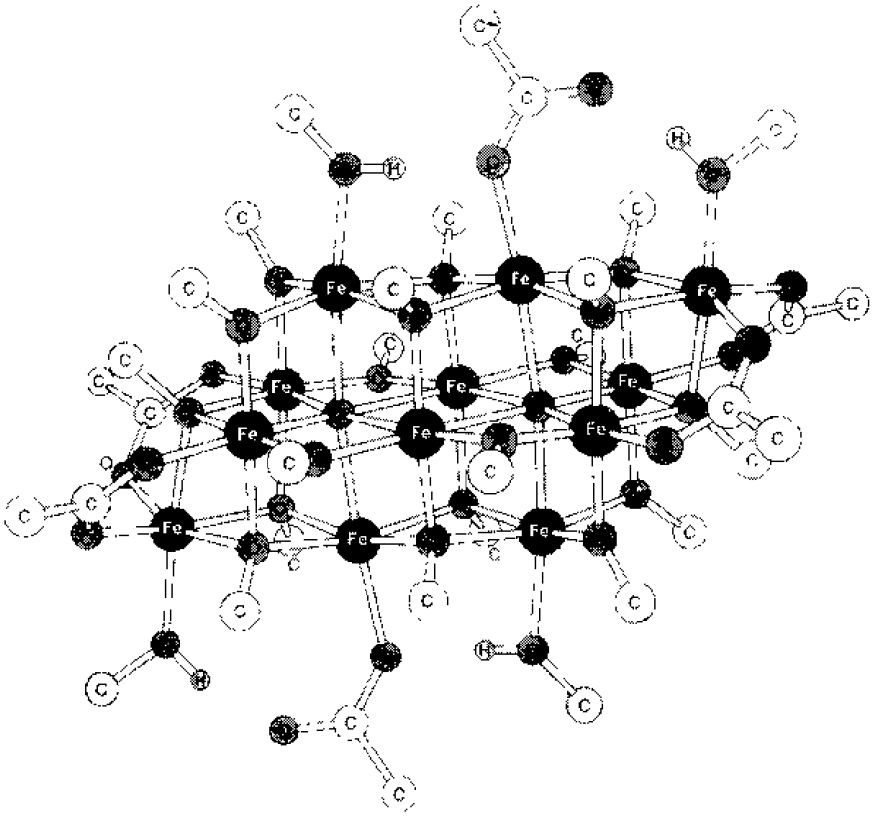


图 5.17　作为铁蛋白核心形成过程中的一个中间体模型而制备的混合价态多铁氧合配合物

总化学式为：$Fe_{12}O_2(OCH_3)_{18}(O_2CCH_3)_6(CH_3OH)_{4.67}$

5.4　特定结构单元

除了前面所讨论的简单水合金属离子和多金属簇合物外，在生物学上还有一些受到人们注意的另外一些专门金属结合分子。这些专门单元不同于如肠杆菌素那样只有单一功能的离子载体。如同铁-硫簇那样，它们能被插入几个不同的金属蛋白并且它们的特性能够为适应某种代谢需要而变化。我们在第三章讨论特殊配体时曾提到它们，在这儿重提，是因为它们在蛋白质和核酸的主要生物无机组分的组装中起着重要作用。

5.4.a　卟啉

卟啉(porphyrin)是四吡咯大环化合物，它们能够结合铁、镁和其他金属离子，形成 4 个氮原子共平面的四方形的排列。卟啉的基本结构如图 1.3 所示。卟啉环周边上的各种取代基减弱了它的电子特征，促进了这类重要金属结合配体的效用。金属卟啉可以通过吡咯环上取代基与蛋白质共扼直接结合在一起，也可以通过配体结合到大环上下的两个可能的配位位置。这两种键都存在于含有卟啉的蛋白质中。

在自由卟啉以及金属卟啉中，卟啉环中心的紧密结构使得发生金属取代和脱金属反应十分困难。铁是被一种称为亚铁螯合酶的酶插入到卟啉中形成血红素的，这个过程需要 Fe^{2+}，将在第 8 章进一步讨论。这种酶可能使卟啉结构变形，以便使吡咯氮原子上的一个孤电子对偏离

环平面与铁结合。金属离子被 N-烷基卟啉螯合的速率较非烷基类似物快 10^4 倍，这个实事支持了上述设想。烷基化能够以促进金属结合的方式使卟啉环变形。该观察结果在很大范围内被应用于 N-烷基化卟啉抗体的设计，这种设计能够将金属离子催化插入到卟啉内（见 8.1.b 节）。

5.4.b 咕啉和氢化卟啉

另一类专门单元是咕啉(corrin)，其结构可以在图 1.3 中找到。像卟啉类一样，咕啉类也是由 4 个吡咯环以大环的形式组成的，4 个氮原子以近似于平面四方形的方式与一个金属配位。然而，最大的不同是缺少一个连接 A 和 D 吡咯环的次甲基碳原子。这个特点使得金属中心的几何构形发生改变，并且对所得配合物的有趣特征的产生有重要的影响。在生物无机化学中，维生素 B-12 分子是钴形成的令人感兴趣的重要配合物。V_B-12 的酶产生了影响 1,2-异构化和促进自由基氧化还原反应的重要功能单元。人们对于 V_B-12 分子与酶结合后激活酶活力的方式还没有充分理解。在自然界中有时发现咕啉以镍配合物的形式存在。该配合物可被嗜热生物体产生甲烷的氢化酶所利用。

另一类与卟啉有关的特殊配体是氢化卟啉(hydroporphyrin)，包括链血红素、二氢卟吩、菌卟吩、可吩和二酮血红素。例如，可吩是一个以 10 个电子还原卟啉所得到的氢化卟啉。这个四吡咯化合物在自然界中以 F_{430}因子存在，F_{430}因子是在亚甲基生成细菌中发现的 S-甲基辅酶-M 还原酶的一个含镍辅基。

5.4.c 金属核苷酸配合物

细胞中最重要并且普遍存在的分子之一是腺苷三磷酸或 ATP。特别是，这个多阴离子的 Mg^{2+}配合物经常被用作磷酰基和核苷酸基转移酶的底物。ATP 的 Mg^{2+}、Ca^{2+}、Na^{+}和 K^{+}配合物是 ATP 酶的重要底物。这些酶催化 ATP 的水解并且利用从这个反应中所得到的能量进行能量传递。正如在第 7 章将要讨论的那样，这类化学对于细胞内的信息传递和贮存具有重要意义。

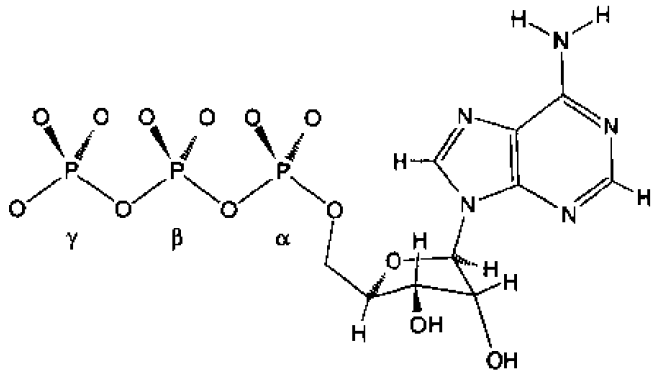
ATP 以及它的几个更为重要的金属配合物的结构示于图 5.18 中。金属离子能够与 α-、β-、和 γ-磷酸脂的氧原子以及有机碱的氮杂原子结合。对于 Mg^{2+}离子，配位作用只发生在氧原子上，水分子占据在金属所形成的八面体的其他位置之上。

5.4.d 钼结合辅因子

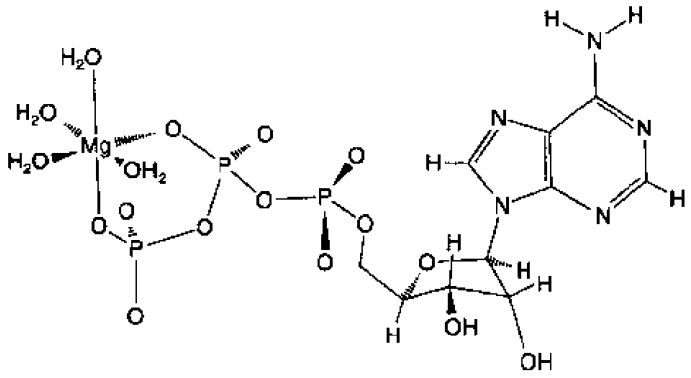
正如前面已提到的，钼是在生物学中惟一的和必需的第二序列过渡金属。它的特殊价值，正如将要讲到的，是它能够进行两电子传递反应的能力，特别是 Mo(Ⅵ)和 Mo(Ⅳ)氧化态之间。此外，它能够按式 5.12 所示的那样，将一个氧合原子转移到底物上：

$$Mo^{Ⅵ}(O)_2+S \longrightarrow S=O+Mo^{Ⅳ}(O) \qquad (5.12)$$

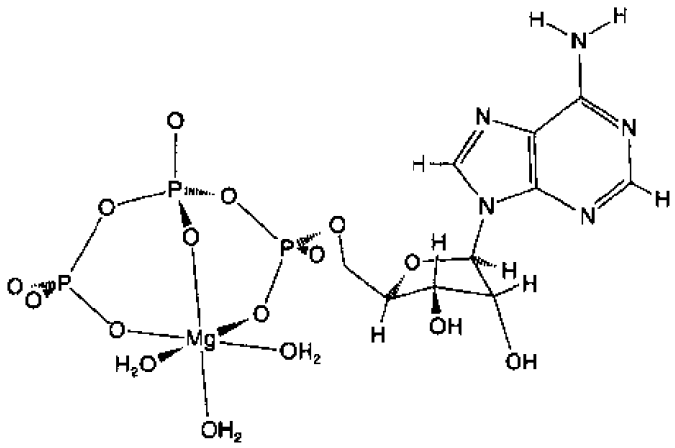
至少有两个特殊辅因子含有钼。其中之一是所谓的 Fe-Mo 辅因子，或 FeMoco。该辅因子存在于固氮酶中。最近固氮酶的钼铁蛋白质的结构通过晶体结构测定（图 5.19），分辨率为 2.2 Å，并且 FeMoco 的一个模型已被提出。该辅因子由两个立方碎片组成，一个含有 4 个铁原子，另一个含有 3 个铁原子和 1 个钼原子。这个钼原子是八面体配位，而在两个立方体碎片界面的铁原子呈现出敞开配位部位。由此特征推测，分子氮与在簇中心的两个或更多的铁原子



Adenosine triphosphate (ATP)



β, γ-Mg-ATP



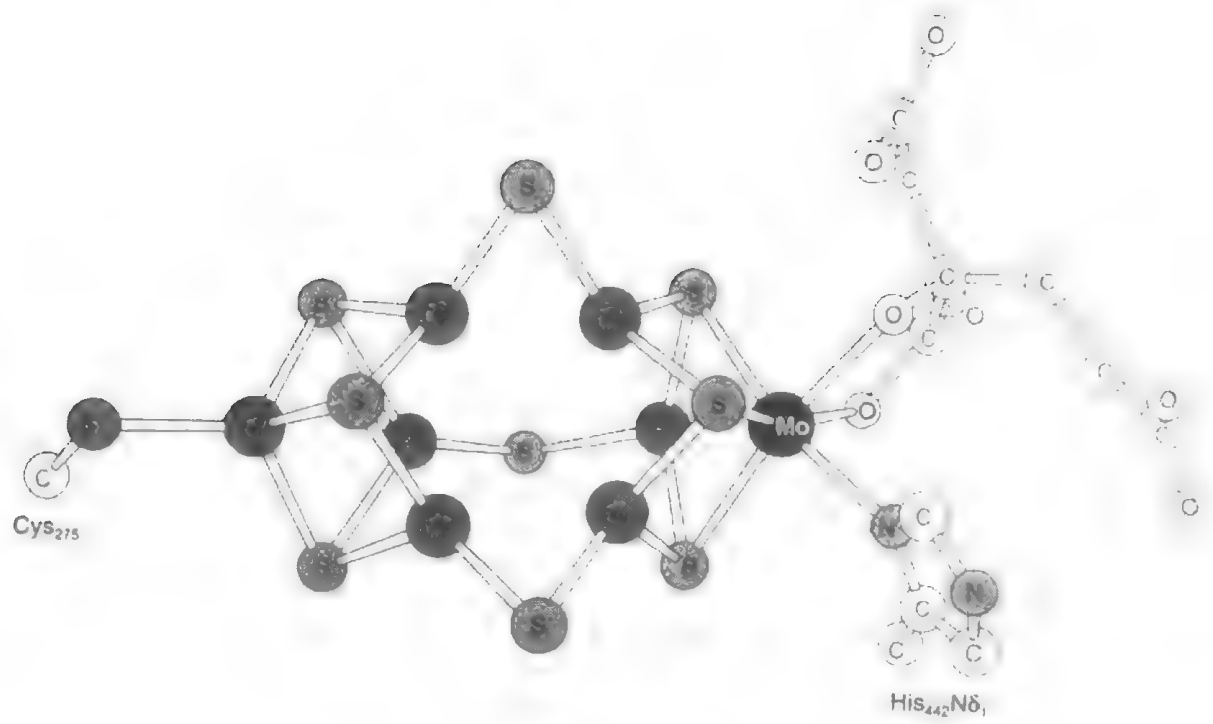
α, β, γ-Mg-ATP

图 5.18　ATP 以及它的几个金属配合物的结构示意图

(a) ATP 的化学结构　(b) β 和 γ-磷酸脂与 Mg^{2+} 结合的 ATP；

(c) α、β 和 γ-磷酸脂与 Mg^{2+} 结合的 ATP

结合从而被活化，但可能不与钼直接配位。这个假设是合理的，因为人们已经发现不含钼的固氮酶，而是含有其他金属，特别是钒和铁。为了证实这个观点，还需要做许多工作。



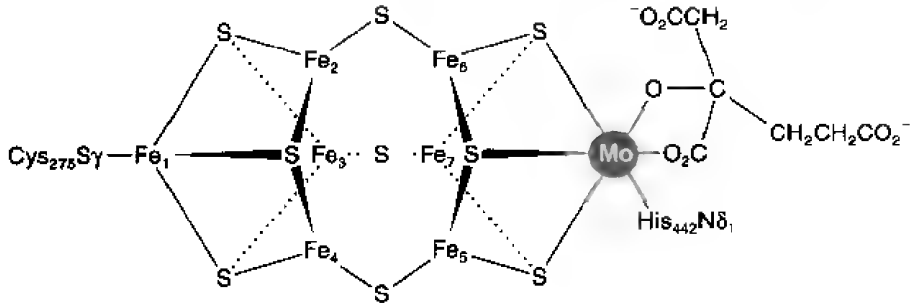


图 5.19　固氮酶钼铁蛋白质的铁钼辅助因子的 X 射线晶体结构

另外一个钼辅助因子存在于还原酶、氧化酶以及脱氢酶中。其在氧合转递化学中的功能见式 5.12。如图 5.20 所示，钼结合部分是一个取代喋呤，该喋呤通过两个硫原子与金属配位。这个修饰喋呤是在硫脲中被发现后得到鉴定的，硫脲是钼辅助因子的一个主要尿代谢产物。除固氮酶外，尽管所有需要钼辅助因子的已知酶都含有一个喋呤衍生物，其他金属配位原子与此显著不同。这个酶的特征类似于前面描述过的金属卟啉的特征。

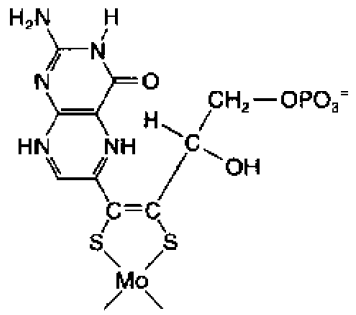


图 5.20　在促进氧合转移反应的蛋白质中发现的钼辅助因子的可能结构

还原喋呤在钼氧合转移酶功能方面的作用有待进一步研究。有机部分能够进行氧化还原反应，而这些反应可能是酶中电子转移途经的整体组分。或者，喋呤仅仅能够用于贮存钼和将钼从一种蛋白质转移到另一种蛋白质。钼的水溶液化学主要研究的是氧合阴离子，如钼酸根 MoO_4^{2-} 以及聚

钼酸根，如 $Mo_7O_{24}^{6-}$。在 pH＝7 时，螯合阳离子是不可能存在的。钼的水溶液化学的这些内容可能需要发展特殊配体用于处理该金属以及将该金属结合在酶的活性部位。

习　题

1. 假设在高 pH 情况下，$[Fe(ent)]^{3-}$ 的离解常数是 10^{-49} mol/L。计算在 1 mol/L $[Fe(ent)]^{3-}$ 溶液中 Fe^{3+} 的浓度。在 1 L 这样的溶液中有多少个游离铁离子存在？计算在中性 pH 情况下，离解常数为 10^{-25} mol/L 时，在 1 mol/L 的 $[Fe(ent)]^{3-}$ 溶液中游离 Fe^{3+} 的浓度。
2. 能否期望肠杆菌素的对映体为铁的良好螯合体？在中性 pH 情况下，你预计它的离解常数是多少？你认为这个对映体对于产生肠杆菌素的细菌摄取铁是否有用？请解释。
3. 在铁氧还蛋白中，[2Fe-2S]簇的模型配合物已经被制备，最特征的模型是全氧化形式 $[Fe_2S_2(SR)_4]^{2-}$，其中两个铁原子都是＋3 价氧化态。这些配合物的单电子还原产物具有 $[Fe_2S_2(SR)_4]^{3-}$ 形式，由于两个这样的配合物发生反应生成一个 $[Fe_4S_4(SR)_4]^{2-}$ 配合物，因此 $[Fe_2S_2(SR)_4]^{3-}$ 形式是不稳定的。写出这个反应的平衡方程式。为什么一个类似的反应在氧化形式下不能发生？你能否设计一个合成路线，以减少这种二聚反应的发生？
4. 磁有规细菌每代产生近 10 个新的磁铁矿粒子。每个矿粒子是一个具有 500 Å (50 nm)边长的近似立方体。磁铁矿 (Fe_3O_4) 的密度为 5.18 g/cm^3。计算每个细菌必须摄取多少铁才能完成这一功能。
5. 利用表 5.2 中的数据绘出铁随平均氧化态变化的曲线图，你将会观察到一个线性关系。假设固氮酶中的铁-钼辅助因子具有的金属离子的化学计量为 $MoFe_6$，并且显示的穆斯鲍尔谱具有的同质异能移 (isomer shift)为 0.37 mm/s。估计铁原子在这个辅助因子中的平均氧化态。注意，该分析假设铁具有四面体硫配位环境。

参 考 文 献

金属离子的生物利用率

E. I. Ochiai. 1987. *General Principles of Biochemistry of the Elements*. Plenum Press, New York.

K. N. Raymond. 1984. "Complexation of Iron by Siderophores. A Review of Their Solution and Structural Chemistry and Biological Function." *Top. Curr. Chem.* 123, 49~102.

低丰度金属的富集策略和细胞内化学

D. P. Bancroft, C. A. Lepre, and S. J. Lippard. 1990. "^{195}Pt NMR Kinetic and Mechanistic Studies of *cis*- and *trans*-Diamminedichloroplatinum(II) Binding." *J. Am. Chem. Soc.* 112, 6860~6871.

P. H. Connett and K. E. Wetterhahn. 1983. "Metabolism of the Carcinogen Chromate by Cellular Constituents." *Structure and Bonding* 54, 93~124.

金属簇的自发自组装

W. H. Armstrong, A. Spool, G. C. Papaefthymiou, R. B. Frankel, and S. J. Lippard. 1984. "Assembly and Characterization of an Accurate Model for the Diiron Center in Hemerythrin." *J. Am. Chem. Soc.* 106, 3653~3667.

J. M. Berg and R. H. Holm. 1982. "Structures and Reactions of Iron-Sulfur Protein Clusters and Their Synthetic Analogs," in T. G. Spiro, ed., *Iron-Sulfur Proteins*. Wiley, New York, 3~66.

D. Coucouvanis. 1991. "Use of Preassembled Fe/S and Fe/Mo/S Clusters in the Stepwise Synthesis of Potential Analogues for the Fe/Mo/S Site in Nitrogenase." *Acc. Chem. Res.* 24, 1~8.
K. S. Hagen, J. G. Reynolds, and R. H. Holm. 1981. "Definition of Reaction Sequences Resulting in Self-Assembly of $[Fe_4S_4(SR)_4]^{2-}$ Clusters from Simple Reactants." *J. Am. Chem. Soc.* 103, 4054~4063.
D. M. Kurtz, Jr. 1990. "Oxo- and Hydroxo-Bridged Diiron Complexes: A Chemical Perspective on a Biological Unit." *Chem. Rev.* 90, 585~606.
E. C. Theil. 1990. "The Ferritin Family of Iron Storage Proteins." *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 63, 421~449.

特定结构

S. P. Cramer and E. I. Stiefel. 1985. "Chemistry and Biology of the Molybdenum Cofactor," in T. G. Spiro, ed., *Molybdenum Enzymes*. Wiley, New York, 411~442.
D. Dolphin, ed. 1978~1979. *The Porphyrins*, Volumes 1~7. Academic Press, New York.
D. Dolphin. 1982. B_{12}, Volumes 1~2. Wiley, New York.
D. Dunaway-Mariano and W. W. Cleland. 1980. "Preparation and Properties of Chromium(III) Adenosine 5'-Triphosphate, Chromium(III) Adenosine 5'-Diphosphate, and Related Chromium(III) Complexes." *Biochemistry* 19, 1496~1505.
J. Kim and D. C. Rees. 1992. "Structural Models for the Metal Centers in the Nitrogenase Molybenum-Iron Protein." *Science* 257, 1677~1682.
S. J. Lippard. 1993. "Bioinorganic Chemistry: A Maturing Frontier." *Science* 261, 699~700.
A. M. Stolzenberg, S. H. Strauss, and R. H. Holm. 1981. "Iron(II,III)-Chlorin and-Isobacteriochlorin Complexes. Models of the Heme Prosthetic Groups in Nitrate and Sulfite Reductases: Means of Formation and Spectroscopic and Redox Properties." *J. Am. Chem. Soc.* 103, 4763~4778.

第 6 章　细胞内金属离子浓度的控制与利用

6.1　金属离子的有益作用和毒性效应
6.2　在严格调节之下的有益金属：铁
6.3　毒性金属实例：汞
6.4　金属离子浓度梯度的产生和应用
6.5　金属药物分布的组织选择性

细胞内金属离子的浓度必须保持在一定的范围之内。金属离子常常由于结合到不适当的位置而产生金属离子毒性。金属离子毒性有时也与随后发生的化学反应有关。金属离子的体内平衡和解毒作用是经过多种机理完成的，包括细胞外的金属运送、含有金属蛋白质的结构变化等。这些变化控制金属离子穿过细胞膜、离子通道和离子泵的被动输送，以及金属的调节转录和翻译作用。细胞利用 pH 和氧化还原态方面的变化影响金属离子与受体分子的结合和释放过程。离子浓度梯度被用于贮存和传递能量及信息。

6.1　金属离子的有益作用和毒性效应

对许多生物化学过程来说，金属离子浓度必须保持在适当范围之内。如果某个特定必需金属离子的浓度太低，需要利用该离子的过程将受到不利的影响，并且生物体将产生金属离子缺乏症。当特定金属离子的浓度高于一个较低界限，才有足够的这种离子去完成它的生物作用。然而，浓度不能够无限地增加而不产生相反的结果。当高于一个较高界限时，金属离子将会产生毒性效应。例如，当一个金属离子结合到一个不恰当的部位时，它可能与其他有益的金属离子竞争这个部位；或者当它在其结合部位不能受到适当控制时，该离子将表现出不良的反应活性。这个讨论说明特定的金属离子具有某些生物功能。某些金属离子没有已知的或假定的生物功能，但是当存在于细胞中时，它们可能是毒性较大的。对这些现象的图解说明，如图 6.1 所示。

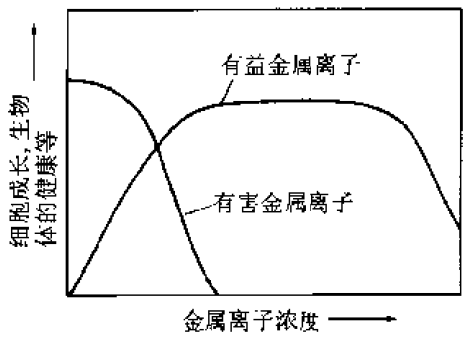


图 6.1　金属离子的毒性和有益作用与其浓度之间的关系图

体内平衡是指有益金属离子的浓度保持在一个恰当的范围之内。解毒是指排除无益金属离子的有害浓度。体内平衡和解毒需要在金属离子的摄取、利用、贮存和排出过程之间有一个平衡。如上所述，在生物体内未被利用的金属离子可能具有相当大的毒性，这多是因为它们非专一性地而又具有很强亲和力地与某些部位结合。这些因为动力学惰性而产生的牢固结合，不易被排除或分泌，使得这些金属阻碍了某些正常过程。产生金属离子毒性的另外一些可能原因包括在生物流体内生成不溶性的盐，参与降解生物聚合物的水解反应，或者产生破坏性副产物，如羟基自由基的氧化还原反应。

这些效应可以用两个实例给以说明。第一个例子是铁元素，它是所有生物体，包括人类的一种必需金属离子。在人体内，它对于分子氧的运送和代谢十分重要(11.1 节)，并且参与一系列电子传递途径(9.1 节)和其他作用。铁的供应或吸收不足，满足不了血红蛋白合成的需要，将引起缺铁性贫血。另一方面，铁也是常见的一般毒性物质。由于偶然性的吸收和疾病，如地中海贫血症的治疗、不恰当血红蛋白的形成、以及过量的输血等会造成铁的吸收超载，过剩的铁将积聚起来且不易被排除体外。一旦铁的贮存机制达到饱和(6.2.d 节)，过剩的金属离子将被排入到体系之内，在那里它们将催化各种各样的含氧自由基的形成，并广泛地损伤组织。为了避免这些副作用的产生，如脱铁肟(图 3.24)等药物被用于螯合铁离子(图 6.2)，并使它们易于排出。

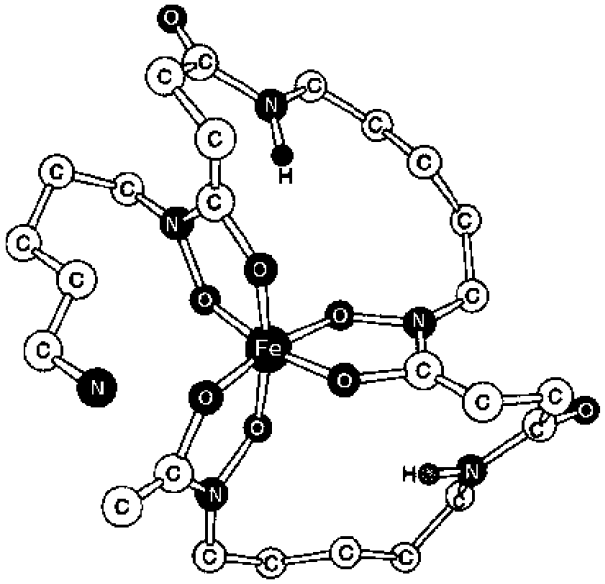


图 6.2　脱铁肟的铁配合物

一种用于螯合铁离子并使之易于排出体外的药物

第二个实例是以铂为基础的抗癌药物，如顺铂。见图 1.8。铂(Ⅱ)配合物是相当难于发生取代反应的，并且一般具有较大毒性。这些特性被利用到顺铂的化学疗法上。顺铂配合物的缓慢配体取代速率使得该药物在高浓度氯离子(0.1 mol/L)存在下的血清内保持相对较低的反应活性。正如在前面一章讨论的，一旦铂原子扩散进细胞，氯离子的取代反应确实能够发生，所产生的阳离子性水合物最终与 DNA 结合成稳定的加合物(7.3 节和 8.3 节)。这些加合物是有害的，但是对肿瘤的有害程度大于对正常组织的有害程度，导致在生物体水平上的有益效应。对比之下，类似的钯(Ⅱ)化合物，*cis*-$[Pd(NH_3)_2Cl_2]$的配体取代速率是顺铂的 10^5 倍，由于其

毒性太大，以致不能被用于癌症的化疗。可能是由于钯配合物与许多生物目标作用太快，以致于在细胞核中不可逆性地损坏 DNA 之前，它自身先产生损伤或失活。

6.2 在严格调节之下的有益金属：铁

我们在此主要讨论铁的传输和贮存体系，特别是哺乳动物的铁传递蛋白质转移铁蛋白以及贮存蛋白质铁蛋白的调节体系。这些体系将说明必须解决的化学和生物学问题，以利于能够有效地进行金属离子的体内平衡控制，以及介绍金属离子在基因表达方面的正在发展的领域。

6.2.a 溶解、摄取和传输

正如在第 5 章所讨论的，铁的水解化学使得该元素在生物体内的调节具有挑战性。最为重要的是在中性 pH 时，Fe（Ⅲ）是十分难溶解的。因此，即使铁在环境中丰度较大，只有很低水平的水合铁存在于溶液中，并且只有很少量的有可能被摄取。前面讨论了利用铁质体隔离铁并使之易于传输到细菌的细胞内。在此，我们将讨论在哺乳动物体内的铁传输。

在哺乳动物体内，从食物中吸收的铁必须被传输到整个体内。这个作用是转移铁蛋白族的蛋白质完成的。这类蛋白质是牢固地与 Fe(Ⅲ) 离子结合，具有近 80 kDa 分子量的糖蛋白。在游离铁完全不溶的条件下，这些蛋白允许铁溶解和传输。该蛋白与 Fe(Ⅲ)结合的 $K_{表观}$常数接近于 $10^{20}(mol/L)^{-1}$。有趣的是，这些蛋白质在与铁结合的同时，也同一个阴离子结合。在生理条件下，阴离子可能为碳酸根离子；即与碳酸根的结合促进了与铁的结合，反之亦然。在细胞内，这个协同作用对于铁的释放可能是很重要的。

转移蛋白族中的几种蛋白质的结构已经通过 X 射线晶体结构法测定。正如早先系列研究中发现的那样，这些蛋白是由 2 个相似的域结构组成的，每个域结合一个铁原子。图 6.3 说明了这种结构。

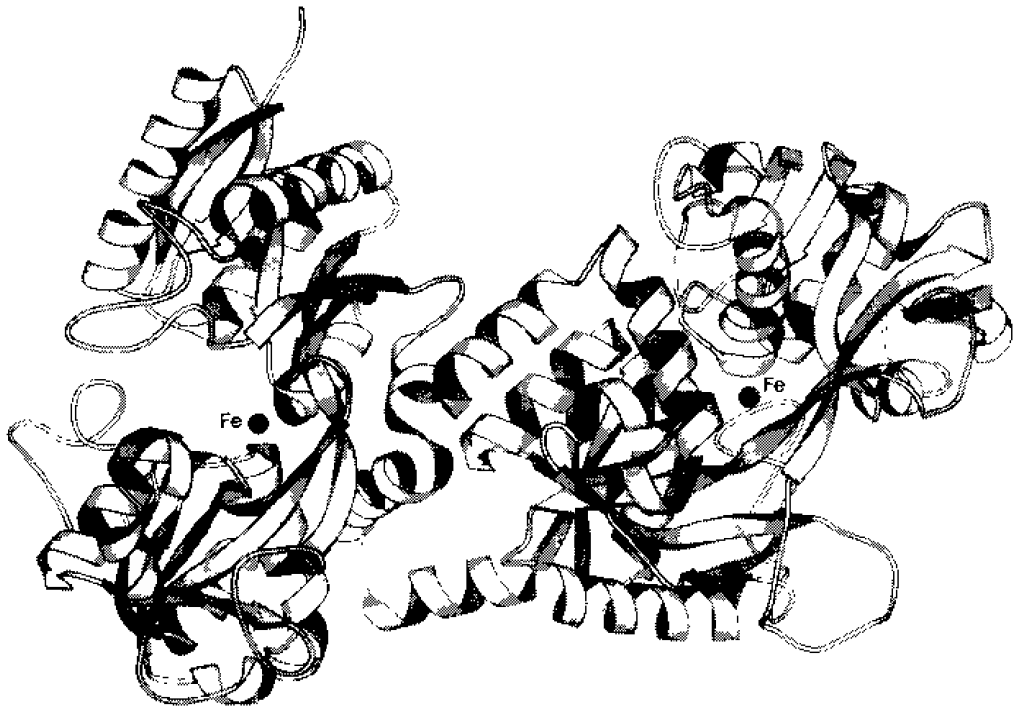


图 6.3 X 射线晶体结构测定的一个铁传递蛋白-乳铁蛋白的铁结合结构

每个域依次由 2 个亚域结构组成。当与铁结合时，亚域结构象一个铰链一样弯曲，即亚域结构紧夹在铁碳酸根单元上。这种结构可以用人乳铁蛋白的结构进行说明。人乳铁蛋白是在人奶中发现的该蛋白族中的一种。乳铁蛋白亚域结构的脱铁及铁结合结构如图 6.4 所示。

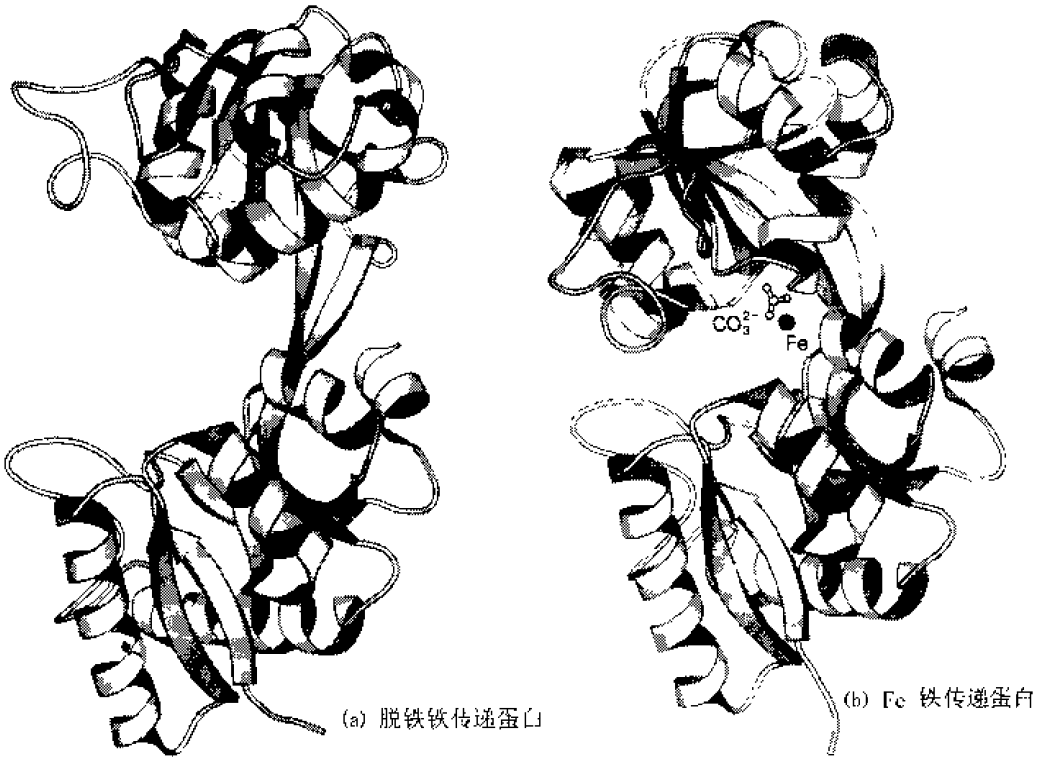


图 6.4　乳铁蛋白的脱铁(a)和铁结合(b)结构的比较
显示与铁/碳酸根配位有关的一个铰链移动

变形八面体铁配位层由来自酪胺酸的 2 个酚盐氧原子、来自组氨酸咪唑上的 1 个氮原子、来自天冬氨酸碳酸根上的 1 个氧原子以及来自邻近碳酸根上的两个氧原子所组成。该碳酸根与来自精氨酸和苏氨酸的侧链以及肽链两个 NH 基团结合成氢键，这个结构如图 6.5 所示。碳酸根与铁原子的协同结合可以用它们的几何关系解释。这个蛋白质明显地有一个用于碳酸根的结合域。该域是由前面所提到的蛋白质侧链和多肽链骨架提供的氢键单元组成的。一旦碳酸根结合到这个部位上，将完美地构成金属结合位置。因此，Fe(Ⅲ)能够在有利于这个相对较硬的金属离子的富氧环境中以八面体形式配位结合。

像肠杆菌素一样，为了被吸收进细胞内，铁传递蛋白也是与一种膜表面受体结合在一起的。该过程是受体促进的细胞吞食作用(endocytosis)普遍现象的一个例子。铁传递蛋白受体是一种含铁的二聚糖蛋白，而不是脱铁铁传递蛋白。在上述铁传递蛋白中，当结合碳酸根和铁时所发生的较大构象变化，对于区别载铁传递蛋白与非载铁传递蛋白是十分必要的。一旦受体与铁传递蛋白结合在一起，包含有受体膜的一部分收缩成所谓的“包被”囊胞。这个囊胞包被是一种被称为内涵蛋白的蛋白质，它能够促进囊胞的形成。在细胞内部，这个囊胞脱去包被形成泡涵体。泡涵体的膜含有 ATP 驱动的质子泵(6.4.d 节)。这些分子将质子抽进泡涵体使其 pH 降低到 5～6。在这样低的 pH 下，由于碳酸根和酪氨酸配体的质子化，铁被释放出来。在铁蛋白中，释放出的铁可以被利用或贮存起来。包含有脱铁铁传递蛋白受体的囊胞的一部分仍然与

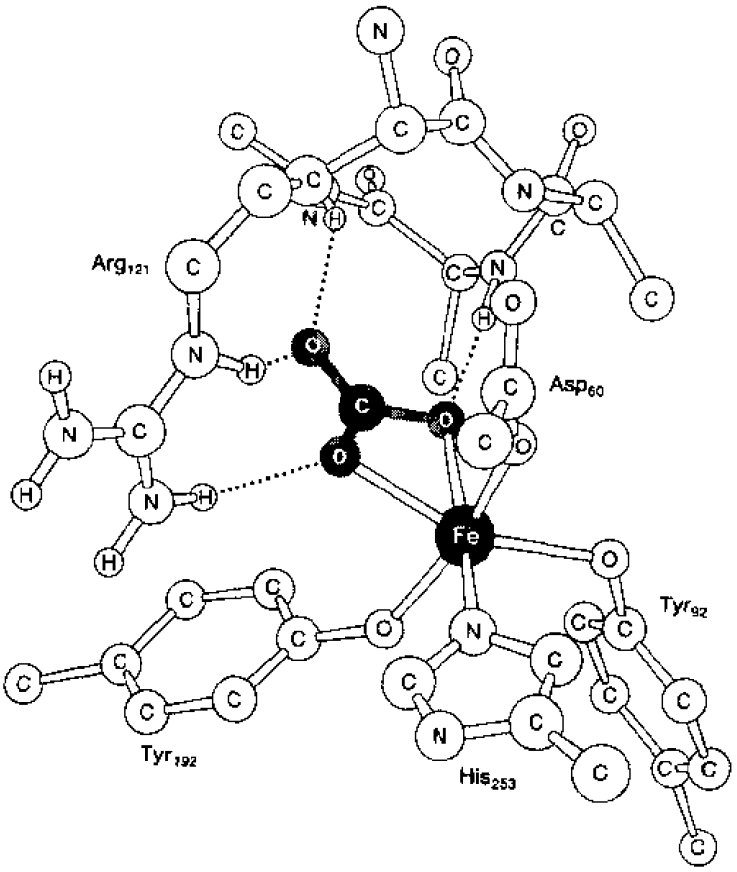


图 6.5　乳铁蛋白的活性部位结构
显示铁与邻近碳酸根离子配位结合

原生质膜溶合在一起。当其所在细胞外的 pH 接近 7.4 时，脱铁铁传递蛋白被释放出来。这个过程能够自动地重复进行。该过程归纳于图 6.6(见 p.101)。在生理条件下，整个循环过程大约需要15 min才能完成。请注意，pH 的差别可用于控制铁结合到铁传递蛋白，也可用于控制脱铁铁传递蛋白结合到铁传递蛋白受体。

6.2.b　摄取和储存的金属调节

生物体也进化出许多方法用于积聚和贮存金属离子供以后使用。最典型的金属离子贮存体系是铁蛋白。铁蛋白的结构和它的多铁核的形成与组分已在前面的第 5 章介绍过。铁蛋白起到了由铁传递蛋白转输进细胞的铁的贮藏所作用。当需要时，铁蛋白可以释放出大量的金属离子。细胞是如何调制铁进出铁传递蛋白的，目前还不十分清楚。然而，最近在铁控制蛋白质基因的生成机理研究方面，取得了许多进展。该种蛋白质在铁质体的生产以及转移铁蛋白受体和铁蛋白脱辅基蛋白的合成方面是必需的。

在转录水平上，细菌中铁质体的生物合成基因是受铁调节的。一个被称为 Fur(铁摄取调节器)的单个蛋白以配位方式调节许多基因。这种蛋白质是一种亚单元分子量为 17 kDa 的二聚体。在二价金属离子如 Fe^{2+} 存在下，该二聚体能够结合到 DNA 的特定部位。但二价金属不存在时，该过程则不能发生。因此，在铁浓度相对较高的情况下，Fur 蛋白质包含有被束缚的金属离子。结合到特定的 DNA 调节序列，抑制相关基因的转录。在较低金属离子浓度下，Fur 蛋

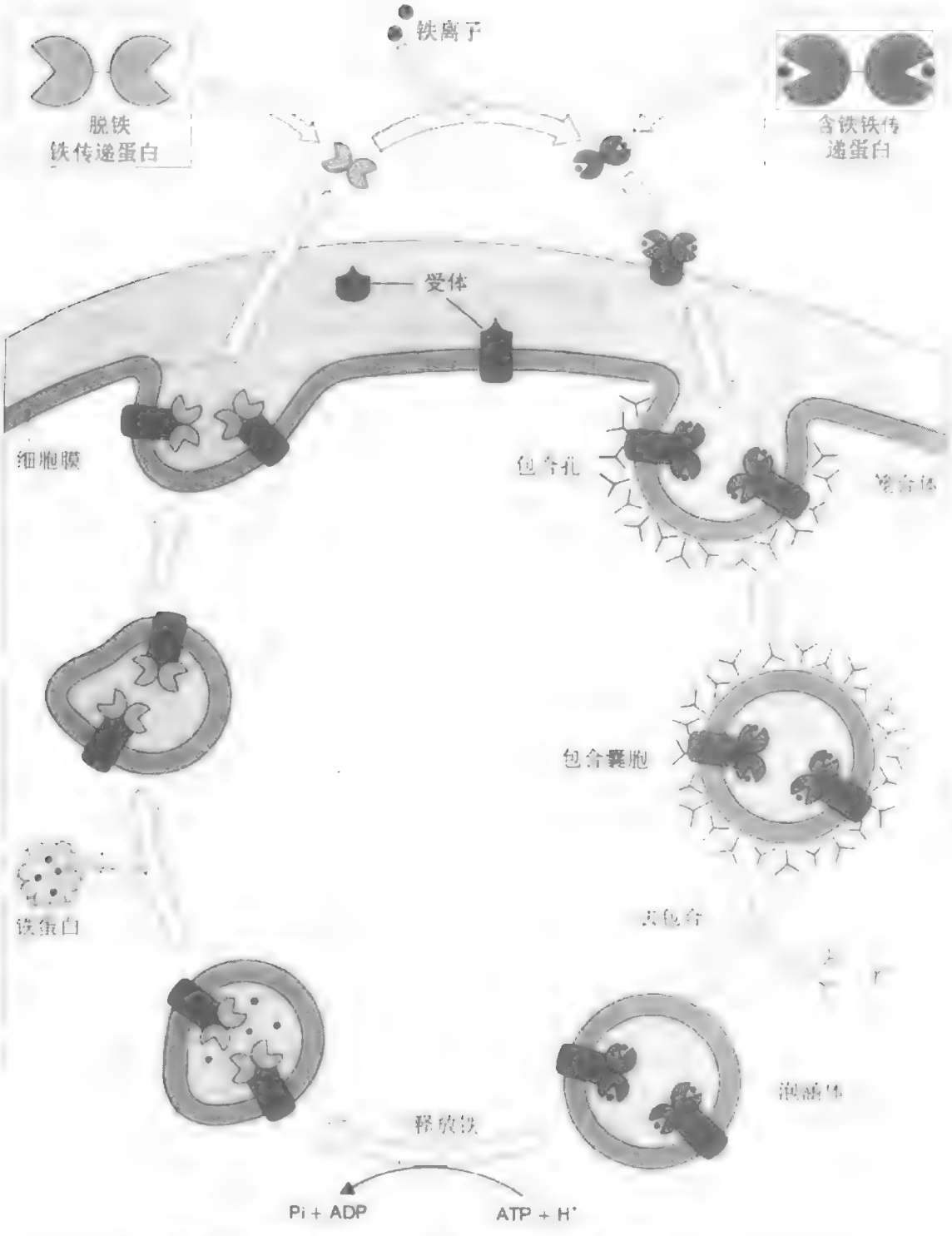


图 6.6　铁与脱铁转移蛋白在细胞外的结合示意图

包括：受体调节细胞吞食作用，ATP-驱动铁释放到囊胞体和金属离子装载到铁蛋白上

白质不与金属离子结合，也不与 DNA 特定结合，基因转录能够进行。

在哺乳动物中铁蛋白和铁传递蛋白受体的表达也是以依赖金属的方式被调节的。但是，蛋白质的表达是在翻译水平上进行调节的。如果细胞内铁的含量较低，贮存的铁蛋白 mRNA 则

被相对翻译得较慢。然而，如果细胞内离子水平增加，铁蛋白 mRNA 翻译的速率则显著地提高。反之，在富铁条件下，铁传递蛋白受体的 mRNA 是相对不稳定的，而在低铁离子浓度条件下，它变得更为稳定。这两种现象是在 mRNA 分子中被类似的序列/结构调节的。这种序列/结构被定义为铁调控元件或 IRE。这些 IREs 形成如图 6.7 所示的茎环结构(stem-loop)，一个 IRE 存在于铁传递蛋白 mRNA 的 5′末端，而另外几个 IREs 在铁传递蛋白受体 mRNA 的相反末端(即 3′位置)被发现。这些 IRE 起着 IRE 结合蛋白的结合部位的作用。IRE 结合蛋白质具有约 90 kDa 顿的分子量。当 IRE 结合蛋白结合到铁蛋白的 mRNA 上时，它将阻止信息翻译成蛋白质；当它结合到铁传递蛋白受体 mRNA 上时，将抑制 RNA 的降解导致翻译进行。这种蛋白质对于含 IRE 的 RNA 的亲和性是受铁调节的。当从用铁螯合剂处理过的细胞中分离

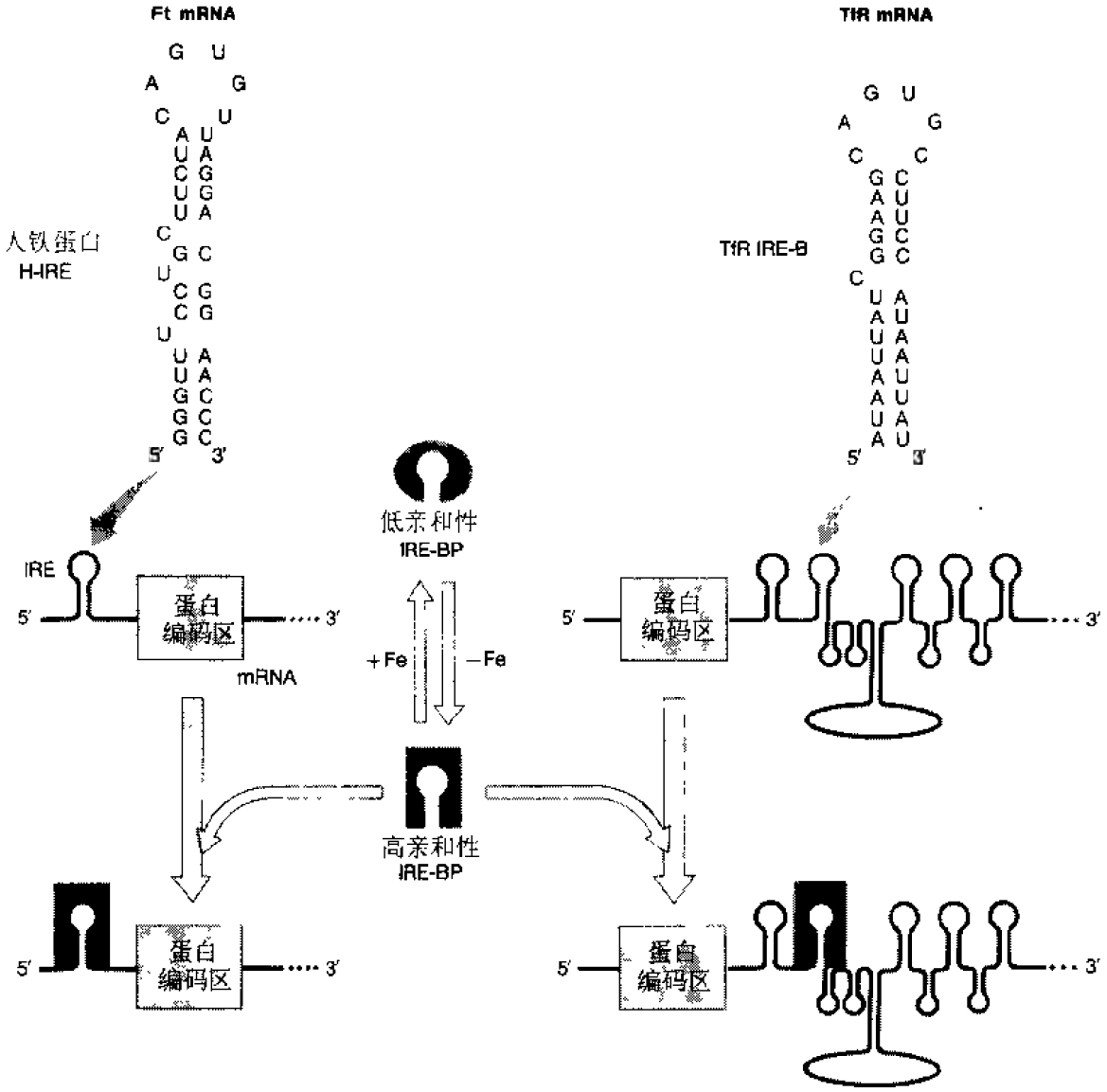


图 6.7　铁调控元件结合蛋白(IRE-BP)对于铁蛋白(Ft)和转移铁蛋白受体(TfR)表达的调节示意图

在高铁水平情况下，IRE BP 与铁结合，并对 IRE 有较低的亲和性，这种特性促进了 Ft mRNA翻译和 TfR mRNA 的降解；在低铁水平情况下，IRE-BP 对 IRE 的亲和性增加，限制了 Ft mRNA 的翻译，并且稳定了 TfR mRNA

出来时，IRE 结合蛋白与 RNA 结合的离解常数约为10^{-11} mol/L。相反，当用铁处理时，其离解常数接近于5×10^{-9} mol/L。

这种蛋白质最近已被纯化，一种对它进行编码的 cDNA 已被克隆和测序。由此推测出的氨基酸序列分析结果揭示，该 IRE 结合蛋白与线粒体顺乌头酸酶是同源的。顺乌头酸酶包含有一个铁-硫簇(5.3.a 节，9.1.a 节和 12.2.b 节)。在适当条件下，顺乌头酸在 Fe_3S_4 簇和 Fe_4S_4 簇之间进行着相互转化。进一步研究表明：IRE 结合蛋白本身具有顺乌头酸酶活性，事实上作用与胞液顺乌头酸酶等同。尽管需要进一步研究这些观察结果的作用和重要性，但是这些结果提示人们建立一种模型，有助于理解细胞内 IRE 结合蛋白对铁浓度变化的适应能力。在高铁离子浓度情况下，簇合物在蛋白质内具有 Fe_4S_4 形式，并且对含 IRE 的 RNA 分子具有较低的亲和性。在低铁离子浓度情况下，这个簇发生离解。这种变化提高了对于 RNA 的亲和性。起转录作用的 Fur 蛋白质和起翻译作用的 IRE 结合蛋白质是随金属离子浓度变化调节基因表达的蛋白质的两个先例。

6.3 毒性金属实例：汞

以上我们概略地讨论了自然界调节生物必需元素——铁的浓度变化情况。同时也发展了许多类似的机制，有效地排出毒性元素。目前理解最清楚的一种解毒过程是来自细菌内的质粒编码汞解毒系统。这个系统也调节了汞的摄取和转移方面，以及它的解毒作用。此解毒作用具有清理细菌外部环境的功效。该系统另一个迷人的特征是，解毒过程也是通过金属离子浓度的调节来控制有关蛋白质编码基因的表达的。

6.3.a 涉及汞解毒过程的酶

对于许多生物体来说，汞离子是有很高毒性的。其部分原因是它对硫醇类化合物具有较大的亲和性。这种相互作用以及伴随所形成加合物的稳定性，使得许多蛋白质和酶结构中的必需硫醇类失去活性。再者，正常的代谢过程可能产生一些比 Hg(Ⅱ)本身毒性更大的有机汞化合物。为了有效地降低这类化合物的毒性，细菌系统利用了两种酶，有机汞裂解酶和汞离子还原酶。这两种酶能够分别催化反应 6.1 和 6.2：

$$RHgX + H^+ + X^- \rightleftharpoons RH + HgX_2 \qquad (6.1)$$

$$Hg(SR)_2 + NADPH + H^+ \rightleftharpoons Hg(0) + NADP^+ + 2RSH \qquad (6.2)$$

此外，一个典型的蛋白质编码操纵子包括这样的一些基因，这些基因对一个周边原生质结合蛋白以及一个膜相关转移蛋白进行编码。这个结合蛋白从有机体周围环境中获得汞化合物，并将它们送到转移蛋白，转移蛋白再将它们运送到细胞质，在此，解毒作用才能真正发生。这个操纵子还包括一个转录调节蛋白 MerR，该蛋白控制着它自身的转录以及用于回应高汞水平等其他基因的转录。我们将首先讨论解毒机理，然后讨论金属调节。

大多数金属-碳键非常容易水解。相反地，汞-碳键普遍相当稳定并且不易于断裂。甚至在 1～100 mol/(min·mol 酶)的中等催化速率情况下，有机汞裂解酶以接近 100 万倍的速率加速其水解。这个 22 kDa 的酶是与底物而不是与辅助因子或金属离子作用催化该反应的。基于底物结构影响产物形成的方式，提出了水解反应的一种机理。实验结果提示，在质子取代汞的过程中，底物的结构和立体化学的完整性得到了充分的保持。该方式排除了自由基和其他中间体产生的可能性。图6.8给出了一种可能的S_E2机理。值得注意的是，这个酶的活性部分与

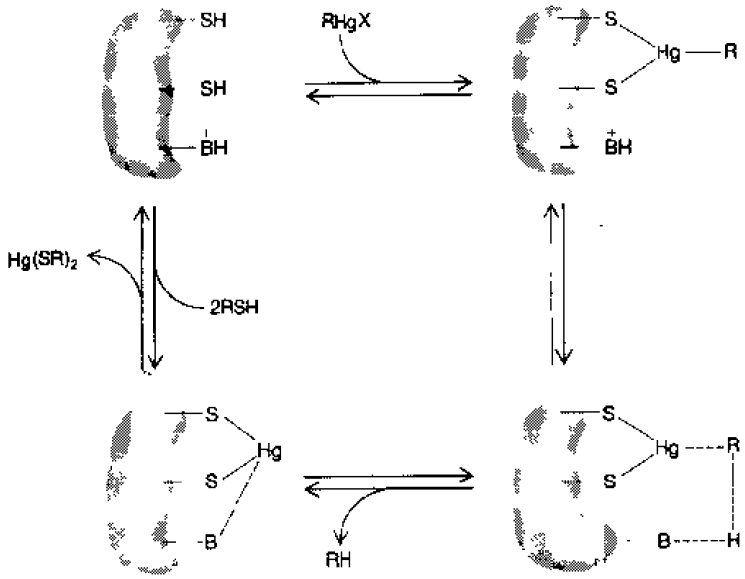


图 6.8　在有机汞裂解酶活性部位处 Hg-C 键裂解的假定机理

该系统中的所有必须蛋白质的活性部分一样，主要由作为汞配体的半胱氨酸巯基组成。

有机汞裂解酶的产物是一个烃硫基汞加合物，$Hg(SR)_2$，它是由内源的巯基如谷胱甘肽与酶的半胱氨酸配体相互交换产生的。因此，这个加合物是汞离子还原酶的一种底物。该还原酶是一个二聚酶，每个亚基的分子量接近于 60 kDa 并且含有一个黄素。同有机汞裂解酶一样，该还原酶还包含有几个必需的半胱氨酸残基，用以结合 Hg(Ⅱ)底物。然而，用半胱氨酸巯基配位汞离子在化学上处于进退两难的困境。在热力学上 NADPH 还原游离 Hg(Ⅱ)是十分有利的。但是，当与两个巯基配体结合在一起时，汞离子的还原电位急剧降低。因此，还原反应的驱动力接近于 0，甚至可能是不利的。所以，为了获得足够的与 Hg(Ⅱ)的亲和性从而除去溶液中其他巯基配体上的汞离子，并且同时提供适当的还原电势，在设计其活性部位时必须达成一种妥协。最近，一个汞离子还原酶的 Cd(Ⅱ)配合物的晶体结构分析表明，这个酶可能利用附属非巯基配体与底物结合来实现以上这个目标。一旦汞离子被结合上，它就被还原为 Hg(0)。这个过程包括氢化物从 NADPH 转移到黄素、随后在 Hg(Ⅱ)配位硫醇盐处受到还原黄素的进攻；接着发生汞的还原以及黄素-硫醇盐加成物的生成；之后，汞原子被释放出来；伴随碳—硫键的破裂，下一个 Hg(Ⅱ)被结合，从而完成一个循环周期。值得注意的是，一旦汞原子生成，它们将很快通过细胞膜扩散到环境中去。汞离子还原酶通过调整其活性中心，从而实现底物结合亲和性与还原电势之间所需平衡的能力，它是第 12 章将要讨论的基本原理的一个早期实例。

6.3.b　汞解毒基因的金属调节

前文所述的活性汞的摄取和结合只有在汞的含量较高的情况下才是需要的。在其他条件下，这些蛋白质的合成将消耗掉能量和前体化合物。此外，体系还可能从环境中吸收一些有害离子。如果只有在危险浓度的汞化合物存在下，体系才能够被表达或活化，则不必担心。这个目标可以通过 MerR 蛋白实现。MerR 蛋白是一种在转录上控制汞解毒基因表达的细胞内汞传感器。

MerR 是一种二聚的 DNA 结合蛋白，它专一性地与 DNA 部位结合。汞的存在与否，仅有

微细的差别。在缺乏结合汞的情况下，表现 mer 基因的转录。一旦汞被结合，它将活化这些基因的转录。这个效应是通过蛋白质 DNA 复合物的结构变化调节的。汞与蛋白质的结合导致了 DNA 以 33°角解旋。因此，汞对 MerR-DNA 复合物产生影响，从而调节 RNA 多聚酶激活转录的能力。汞对转录影响的定量分析揭示出一个值得注意的结果：这个体系呈现出极高的灵敏度。即使单个汞离子与蛋白质 DNA 复合物结合，汞浓度的变化对转录作用也会产生很明显的影响。这种现象图 6.9 给以说明。一旦细胞内的汞浓度达到一定的界限，解毒功能基因即被快速转录。达到最大转录速率一半时所需浓度接近于 10 nmol/L。其他金属离子，如 Cd(Ⅱ)、Au(Ⅰ)、Zn(Ⅱ)和 Au(Ⅲ)也能够诱导转录的活化，但需要将浓度提高 2～3 数量级。

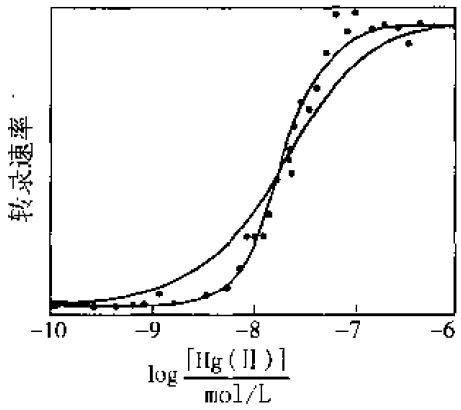


图 6.9　一个 MerR 依赖启动基因的转录速率对汞浓度的依赖关系示意图

该依赖关系比预期的单个 Hg(Ⅱ)结合 MerR 蛋白的变化更为陡峭［摘自 D. M. Ralston and T. V. O'Halloran, *Proceedings of the National Academy of Sciences* U. S. A. 87, 3846～3845(1990)］

通过多种方法研究过 MerR-Hg(Ⅱ)配合物的结构。直接结合实验显示，每个 MerR 二聚体能够结合一个汞离子。光谱和诱变研究表明，每个汞与 3 个巯基结合，其中一个巯基可能是来自于一个亚单元，而另两个巯基可能是来自于另外一个亚单元。汞离子在亚单元表面的结合可能诱导这个二聚体的构象发生变化并传递到 DNA。对这个有趣的蛋白质以及它与 DNA 形成配合物结构的进一步研究，将更为详细地揭示其作用机理。此外，随着更多体系如该例以及前面讨论过的 Fur 蛋白被表征，人们将获得有关金属离子控制基因表达和影响金属离子体内平衡的一些普遍性结论。

6.4　金属离子浓度梯度的产生和应用

穿越膜的离子梯度被用于贮存能量和信息。特别重要的离子有钠、钾、钙和氢离子，并且它们的离子梯度在生物能量学和神经系统功能方面具有根本性的意义。对于和离子泵有关的体系以及构成通道的体系，蛋白质的两种类型是必须的。泵的功能在于使离子穿越细胞膜发生转移，同时促进伴随的 ATP 与 ADP 的相互转化。因为这些蛋白质催化水解 ATP 或者利用 ADP 和无水磷酸盐合成 ATP，它们也被称为 ATP 酶。它们能够产生并保持离子梯度或用既存的离子梯度合成 ATP。通道在离子梯度驱动下传递离子穿越细胞膜。通道与泵的区别在于，离子的传递与 ATP 的水解和合成没有直接的联系。然而，通道不是简单被动的离子传递体系，它们受到闸门控制。它们传递离子的能力受到其他条件或膜电位或外源性配体如神经传递质的浓度等的影响。闸门允许通道将信息从一种形式转换成另一种形式。目前，人们已经发展了在通

道中观察单一分子行为的技术。在如此高水平的分辨率条件下，控制这些体系的能力为化学工作者提供了极难得的机会。在详细讨论泵和通道的特性之前，我们将提出几个在理解这些过程中有用的概念。

(i) **膜电位，膜两边电位之差**。膜电位可以认为是由于膜两边离子浓度的差别所决定的每个离子的电位总和。由于这样的差别，这些平衡电位可以被看成产生转移某个特定离子的净驱动力的数值。根据 Nernst 方程，浓度差决定电位(方程 6.3)：

$$V=(RT/ZF)\ln(c^{out}/c^{in}) \tag{6.3}$$

这里 R 为气体常数，T 为绝对温度，Z 为离子电荷，F 表示 Faraday 常数，c^{out}表示细胞外的离子浓度，c^{in}表示细胞内离子浓度。一个典型的哺乳动物细胞内外部离子的组成列表于表 6.1。

表 6-1　哺乳动物骨骼肌的自由离子浓度和平衡电位

离子	细胞外浓度 (mmol/L)	细胞内浓度 (mmol/L)	[离子]$_{out}$与[离子]$_{in}$之比	平衡电位 (mV)
Na^+	145	12	12	−68
K^+	4	155	0.026	−99
Ca^{2+}	1.5	$<10^{-7}$mol/L	>15000	>+128
Cl^-	123	4.2	30	−90

因此 Na^+的平衡电位是

$$\frac{(8.314\ \mathrm{J\cdot K^{-1}\cdot mol^{-1}})(310\ \mathrm{K})}{(+1)(96\,485\ \mathrm{C\cdot mol^{-1}})}\ln\frac{145\ \mathrm{mmol/L}}{12\ \mathrm{mmol/L}}=+68\ \mathrm{mV}$$

同样，K^+的平衡电位是 −99 mV。

(ii) **电导**。通道不允许所有的离子以同样的效率传递。相反地，它们表现出不同等级的离子选择性，从阳离子与阴离子之间最简单的区别到某个特定离子如 Na^+和与其十分相似离子之间的高度分辨。分辨出紧密相关的离子的能力是十分重要的功能，尽管理解它的化学基础的细节在将来仍然是一个重要的挑战。通道传导的电流对电压的依赖关系是受欧姆定律支配的，见方程 6.4。在此，i 表示电流，g 表示电导，V 表示电压或膜电化学电位的净差值。电导 g 的单位是 Ω^{-1}或 S(西门子)。正如我们在 6.4.d 节将要看到的，离子通道的电导是一个分子特征：

$$i=g\times V \tag{6.4}$$

6.4.a　离子梯度的产生

离子梯度的产生是一个能量依赖过程。所需的能量是由 ATP 水解产生 ADP 和无机磷酸盐提供的。前面所提到 Na^+和 K^+梯度的产生机制是由 Na^+-K^+ ATP 酶主要负责的。这个内在的膜电位由两部分组成，一个 100 kDa 的催化亚单元和一个 45 kDa 的结合糖蛋白，形成一个 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体。酶催化过程见方程 6.5：

$$3Na^+_{in}+2K^+_{out}+ATP+H_2O \rightleftharpoons 3Na^+_{out}+2K^+_{in}+ADP+Pi \tag{6.5}$$

有关该反应，有几点需要说明：(i) 它涉及膜两边的电荷的净传递。每 3 个钠离子被传递到膜外就有 2 个钾离子被泵进膜内。(ii) ATP 的水解是与离子传递紧密相关的过程，这种紧密相关对于酶功能的发挥是至关重要的。因为没有这种紧密相关就不能使 ATP 有效水解。即使是十分完美的相关，一个典型的哺乳动物细胞通过该酶估计要消耗掉它本身 30%的 ATP。

Na^+-K^+ ATP 酶的详细分子结构和作用机理目前还不清楚，其作用机理的一个略图如图

6.10 所示。钠结合到膜的内侧使酶分子上特定的天冬氨酸的磷酸化作用易于进行。这个过程诱导构象变化并导致 3 个钠离子穿越细胞膜。再次，钾结合到膜的外侧催化该酶的脱磷酸作用。随后，构象发生翻转，将 2 个钾离子传输进细胞。有关分子细节，包括 Na^+ 和 K^+ 的配位化学有待进一步阐明。

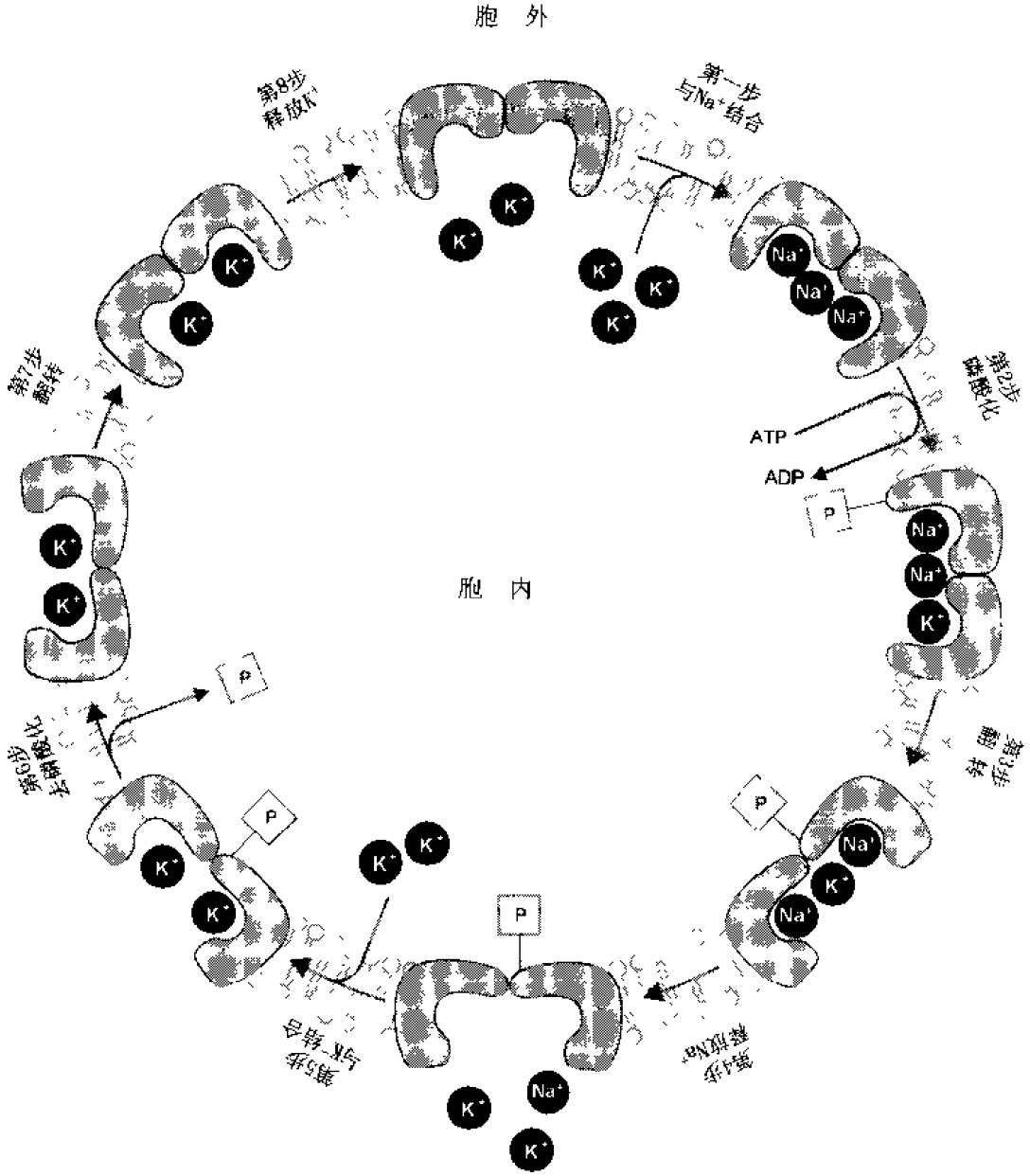


图 6.10　在 Na^+-K^+ATP 酶作用下，依赖 ATP 使 3 个 Na^+ 被传递到胞外、同时伴随 2 个 K^+ 被泵进胞内的过程示意图

6.4.b　通过离子通道进行的离子传输

Na^+-K^+ ATP 酶能够以每秒 100 次的速率发生翻转。相反地，离子通道是每秒能够转输 10^6～10^7 个离子的蛋白质。这么快的离子传输速率对于快速信息事件，如神经内负责信号传递的活动电位的产生，是十分重要的。通道能依各种构象状态存在，有些是“开放的”，并且能够传

送离子，另外的则是“关闭的”或“失活的”并且不能够传送离子。我们将详细讨论两种离子通道：乙酰胆碱受体，一种受神经传导器控制的通道和钠通道，一种电压控制通道。

6.4.c 乙酰胆碱受体

乙酰胆碱受体是一个巨大的复杂分子。其结构在原子水平细节上还没有最终确定。但是，利用一系列生物化学、生物物理学和分子生物学技术，已经获得了该分子结构的一个整体图像。再者，通过电生理方法，包括能够观察到单个乙酰胆碱受体分子活动情况的方法，已经获得了该蛋白质活动机理的许多信息。乙酰胆碱受体的生理学作用如图 6.11 所示。

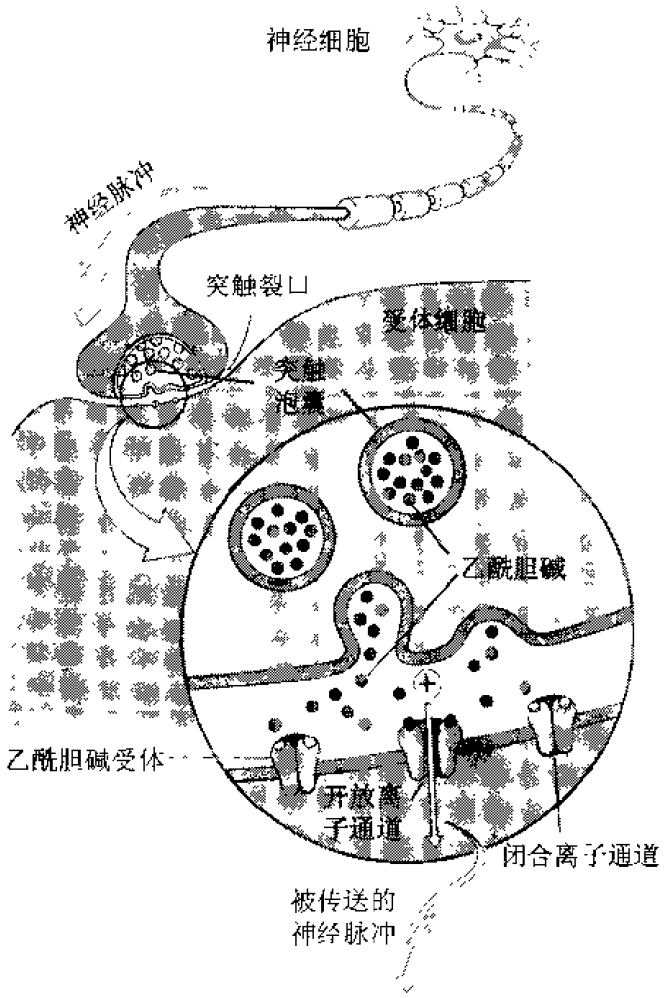


图 6.11 从神经末端释放出乙酰胆碱，导致乙酰胆碱与相反膜上的受体结合在一起，并伴随离子通道开放

乙酰胆碱受体是一个巨大的低聚糖蛋白。它包含有 4 种不同类型的 5 条多肽链，其总的化学计量为 $\alpha_2\beta\gamma\delta$，总分子量接近于 300 kDa。它主要在肌肉、脑髓和一些特殊器官，如电鱼 torpedo 的 electroplax 内被发现。来自于小牛肌和 torpedo 的所有亚单元的氨基酸顺序都已从 cDNA克隆推导出来。分析结果清楚地表明这 4 个亚单元是同源的，都与一个共同的主序列有关。这些肽链具有 437～501 个氨基酸，后者存在于 torpedo 体内。每个糖蛋白结合两分子的神经传感乙酰胆碱，每分子乙酰胆碱结合一个 α-亚单元。

这个受体的总体结构已经电子显微镜研究确定，其结构示意图如图 6.12 所示。5 个亚单

元围绕一个相对开放的中心核按五边形顺序排列，一个巨大的结构域扩展到细胞膜的外侧，而一个较小的结构域存在于膜的内侧。对亚单元的氨基酸序列中疏水残基分布的分析，可以识别跨越细胞膜的范围。图 6.12 给出了一种推测结构。

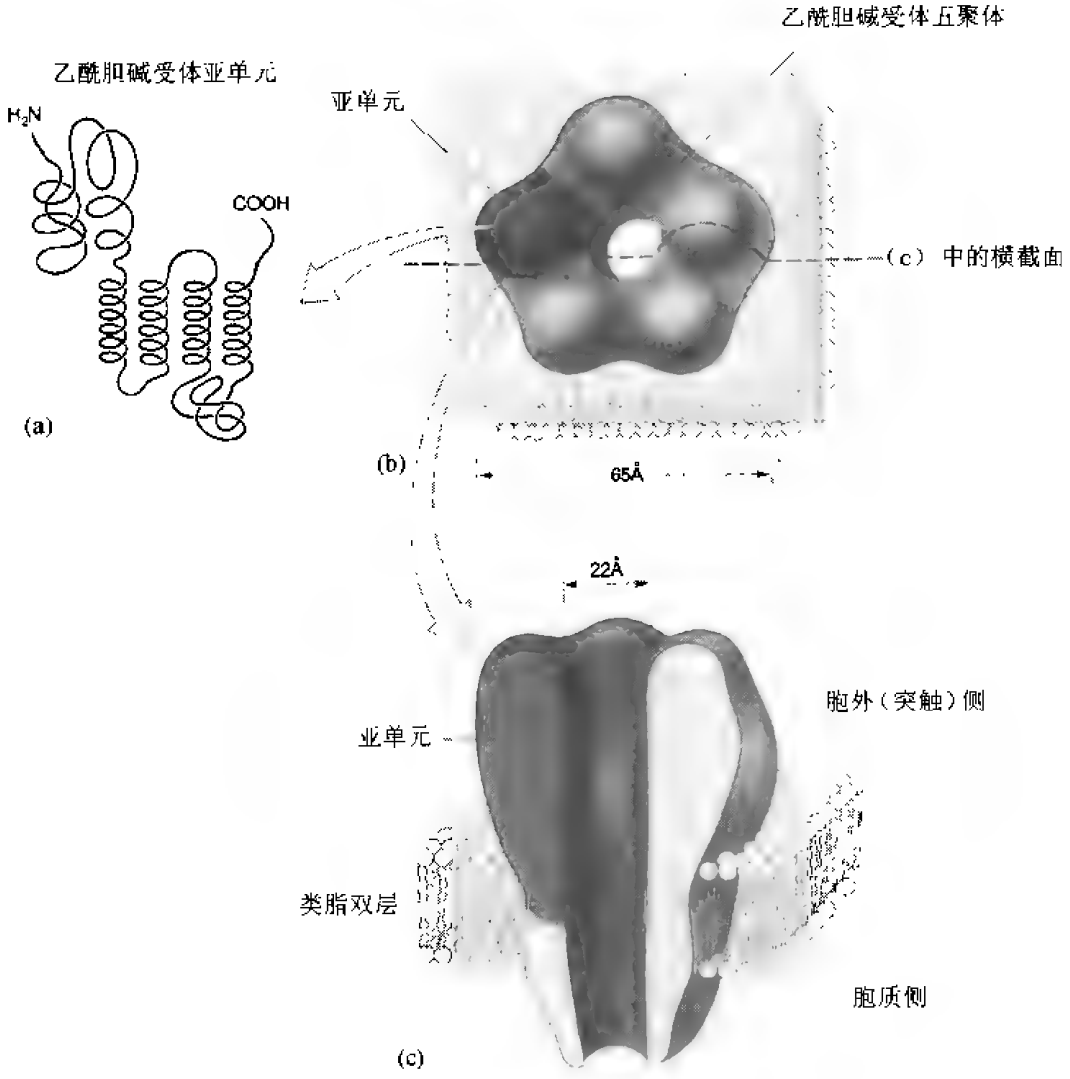


图 6.12　乙酰胆碱受体的结构

（a）在氨基酸顺序分析的基础上，提出的一个亚单元的结构示意图；（b）在电子显微镜研究基础上的俯视图，显示 5 个亚单元呈五边形分布；（c）包括离子通道的跨膜域的截面图

在每个亚单元对应位置上，20～25 个邻近疏水残基有 4 个伸展方式，这些结构好像类似于细菌光合成反应中心的相似顺序。经 X 射线晶体结构衍射研究发现，光反应中心的结构是跨越膜的 α 螺旋体。这些区域特别有趣，其中一些在形成膜离子通道方面发挥着一定作用。正如我们将要看到的，定点突变研究表明，第二个假定跨膜螺旋体可能构成了通道的内壁。

离子被分子传输通过细胞膜是按照两种本质不同的机理中的一种进行的：(i) 离子结合一种载体，载体进行平动或旋转扩散通过细胞膜，然后将离子释放出来。(ii) 穿越细胞膜形成一个微孔，不需要输送体进行大的移动，离子就可经过微孔穿越细胞膜。乙酰胆碱受体是后一类机理的一个实例。在正常情况下，通道是关闭的，并且没有太多的离子通过细胞膜。然而，在

乙酰胆碱存在下，受体分子具有过渡到开放状态的可能性。在开放状态下，离子能够自由经过。乙酰胆碱受体是一种非专一性阳离子通道，只有带正电荷的离子才能通过，但是对各种不同的正离子有很小的区别。在生理条件下，钠离子是经过该通道的主要离子。如上所述，离子能够以很快的速率经过该通道。每经过一次转换，肌乙酰胆碱受体能保持 10 ms 开放状态，但在此时间段内，有近 10^4～10^5 个离子穿过膜。这个流量相当于一个几皮安(pA，10^{-12}A)的电流。

由于每分子构象的变化将有 10^3 个离子通过细胞膜从而产生巨大的放大因子，以及因此产生的信号能够以电流的形式容易测量，所以有可能发展一种方法用于控制运转中的单个通道。这种方法被称为膜片钳(patch-clamping)，如图 6.13 所示。移动一个具有光滑表面的微吸管到细胞膜，轻微吸取，使吸管口的细胞产生一个非常紧密的封口，以致使任何流经两个电极(一个在吸管内，另一个在细胞内)的电流必须经过封口所覆盖的细胞膜的 patch。由于测量皮安(pA，10^{-12}A)电流的灵敏方法的出现，使得在乙酰胆碱存在下记录单离子通道电流成为可能。这种记录操作如图 6.13 所示。

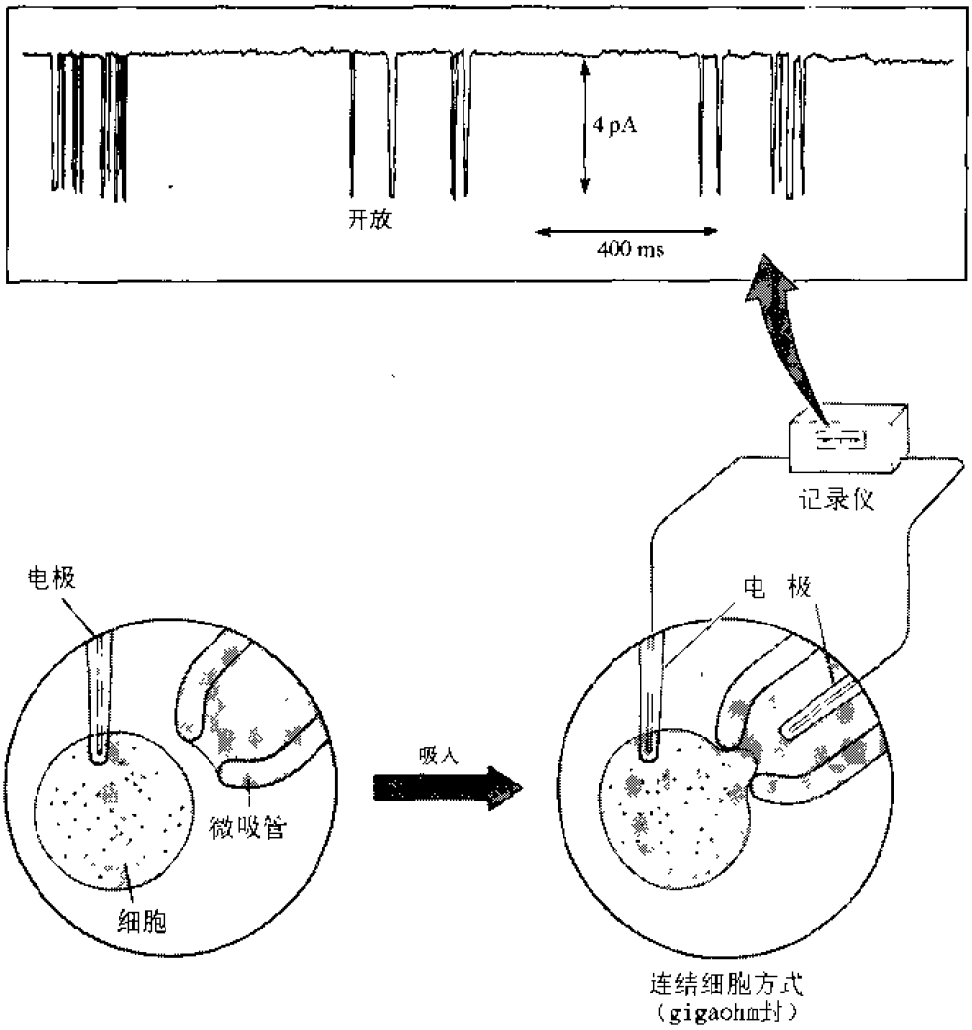


图 6.13 膜片钳法测量经过离子通道的电导

在扫描图中，方向朝下的测试信号对应于单个离子通道分子的开放

电流的跳跃对应于单个乙酰胆碱受体分子从关闭到开放状态的构象变化。在同一时间内，控制经过多个通道电流的新老方法能够对不同离子在通道中的渗透率进行精确测量。如上所述，乙酰胆碱通道对通过它的离子是非选择性的。除与生理有关的离子外，如二乙基铵离子那么大的正离子也几乎同钠离子一样能通过这些通道。由此可以清楚地看出，离子能够以它们的溶剂化形式而不需要除去与它们紧密结合的水分子顺利通过乙酰胆碱受体通道。

包含有大量乙酰胆碱受体的膜区域的行为，可以通过叠加许多单个通道的过程或单个通道多次重复进行而获得。这个聚集电流如图 6.14 所示，并且表明整体行为可以依据大量独立的单个分子的特性解释。控制单个分子的能力，使得对问题进行直接研究在统计热力学方面成为可能。再者，这些方法使得解释乙酰胆碱闸门控制的模型得到进一步发展和验证。例如，如图 6.15 所示，在不存在高浓度乙酰胆碱的情况下，通道是关闭的。然后，乙酰胆碱被从泡囊中释放出来(图 6.11)，引起其浓度的突然增加。一分子乙酰胆碱与受体结合，但是受体仍保持闭合状态。一旦第二个乙酰胆碱分子发生结合，则受体进行构象转化为开放状态的可能性大大增强。因此可以观察到通道开放的显示。最终，由于扩散和乙酰胆碱酯酶引起的水解使得乙酰胆碱浓度降低。此外，由于长时间地暴露于乙酰胆碱，受体能够经过一个过渡转化为失活状态。该失活状态与其他闭合状态有明显的区别。这个机理预示通道开放可在瞬间突然发生，随后在一个相当长的周期内只有一分子的神经传递质被结合。这种行为能够被观察到。

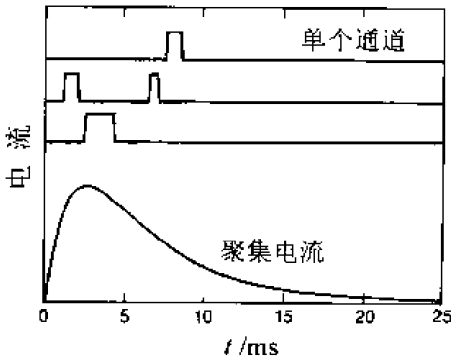


图 6.14　通过一个膜的聚集电流可以被分解为对应于单个离子通道分子的开放和关闭状状态的组成成分

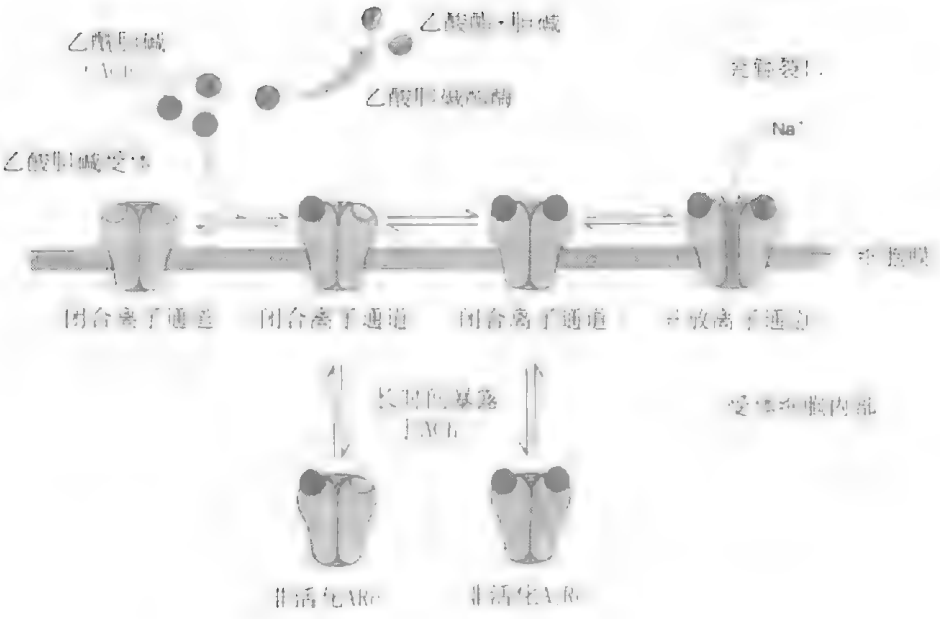


图 6.15　乙酰胆碱受体离子通道的开放随其浓度和时间变化关系推理示意图

这些记录技术已经与某些有力的分子生物学方法结合在一起，用来探索在通道形成过程中实际参与的受体区域。现在能够通过制备 4 个亚单元的信使 RNAs 并将它们极少量注入卵母细胞(蛙卵)，表达乙酰胆碱受体。膜片钳研究表明，功能性受体可以在卵母细胞的表面被发现。并且这些受体的性质与在组织中分离得到的受体性质的差别很小。这个表达体系可以使经过定点突变修饰的氨基酸顺序受体得到进一步研究。在一项研究中，位于 4 个亚单元的第二个跨膜螺旋体前面等同位置的丝氨酸残基分别进行突变得到丙氨酸。膜片钳实验揭示，专一结合到受体开放通道构象上的化合物的亲和性，随着丝氨酸数目的减少而降低，说明这些残基可能形成通道的一部分。为了更详细地验证这类离子通道形成重要大分子原型的结构模型和功能特性，进一步的研究是至关重要的。

6.4.d 电压调控钠通道

如上所述，乙酰胆碱浓度的突然增加引起乙酰胆碱受体呈开放状态，这个过程允许钠离子移动通过通道，因此，邻近于受体高浓度区域的膜电位发生变化，静止膜电位从接近于大约 −100 mV的钾平衡电位向大约 +70 mV的钠平衡电位变化。膜的局部去极化作用产生动作电位。动作电位是膜的一个巨大去极化作用后再进行的快速极化作用过程所产生的电位，如图 6.16 所示。

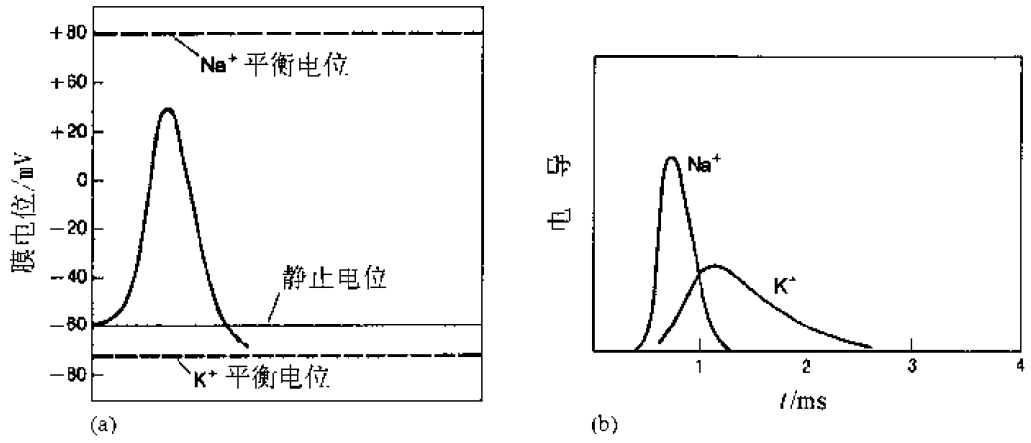


图 6.16 活动电位(a)和它的组成成分(b)

该电位是由于钠离子进入细胞的电导与随后钾离子排出细胞的电导产生的

以 50 m/s 的速率向膜移动的电位对神经传导起着重要作用。动作电位主要是由于膜上对电压敏感的钠通道的存在而产生的。当膜电位接近于静止电位值时，这些通道是闭合的；但是当电位朝负值逐渐变化时，通道向开放状态转化。因此伴随乙酰胆碱受体的开放，膜的极化引起钠通道的开放，从而进一步促进膜的极化。随着更多的钠离子穿过细胞膜，去极化作用几乎扩展到膜的所有区域，引起钠通道接近开放状态。由于钠通道只在几个毫秒的很短时间内保持开放状态，因此产生一个脉冲，随后通道向失活的闭合状态过渡。膜在专一钾通道帮助下重新极化。钾通道在最初的去极化状态下是开放的，但开放速率比钠通道缓慢。

图 6.17 所示的是一个活动电位的传播。对电压敏感的钠通道也已经被纯化、克隆，并且发现它是由一个大型蛋白和两个较小的附属蛋白组成，其巨大的亚单元的分子量大约为 270 kDa。推理所得的氨基酸序列的分析结果表明，它是由内部重复的 4 个域组成，每个域有大约

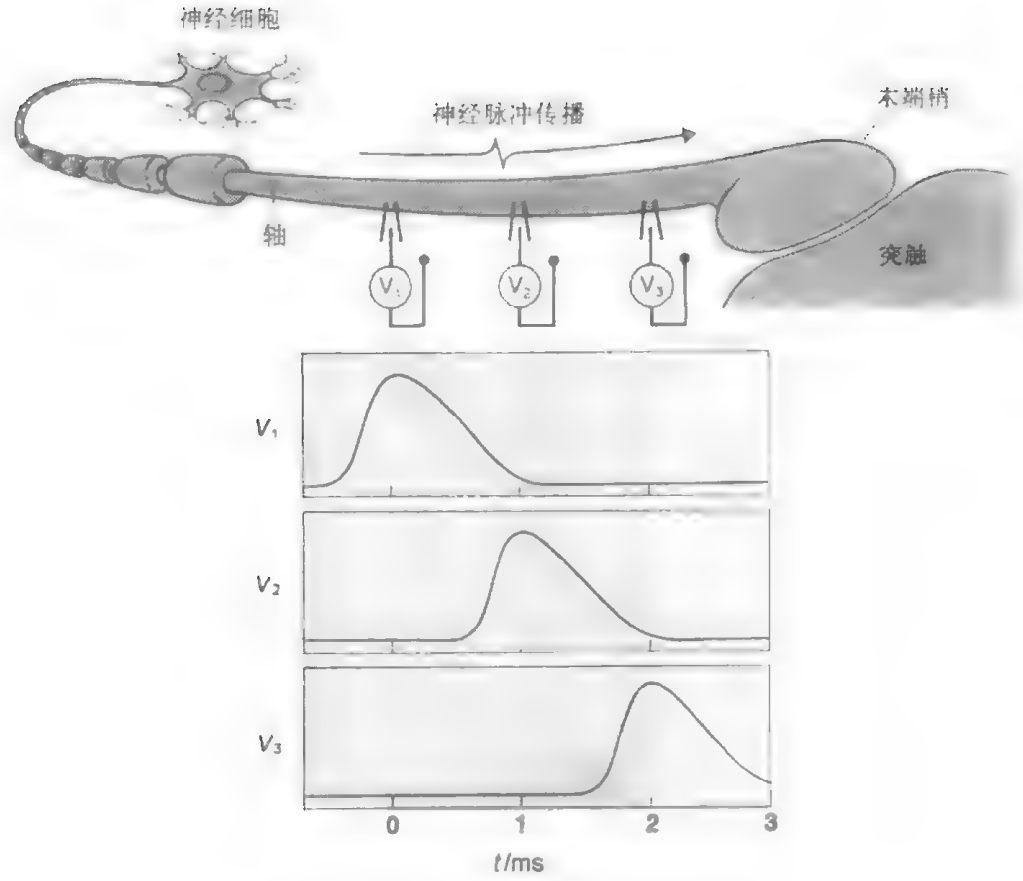


图 6.17　活动电位沿着神经轴方向的传播

600 个氨基酸，包含 6 个假定的跨膜螺旋体，结构如图 6.18 所示。这个蛋白质的内部重复结构在某种程度上类似于乙酰胆碱受体。关于这些通道的结构，几乎没有任何其他信息。但是，有几条依据与它们的离子传导性质有关。

不同于乙酰胆碱受体，钠通道对钠离子的选择性远高于其他离子，包括钾离子。钠通道对钠离子较钾离子有高度选择，是由于前者有较小的体积，因此使得钠离子能够通过通道的狭窄部分。一系列离子经过这个通道的渗透实验强有力地支持这个理论。钠的渗透性比钾的渗透性大 11 倍，其他离子如锂和羟铵可以非常容易地通过这个通道。这些观察很容易与一个假设相一致，即该通道有一个限制条件，它可以使带有一个结合水的钠离子顺利通过，而对离子半径较钠离子大 0.3 Å 的钾离子非常强烈地抑制。第二条证据是钠离子电导对 pII 的依赖性。随着 pH 的降低，电导减少，并且有关数据符合一个表观单质子结合常数 $pK_a=5.5$。这个结果指出，当一个离子通过通道的限制速率区域时，单个的羧酸残基能够接近或与该离子相互作用。最后，通过重建在平面双层类脂中的纯化的钠通道，研究了离子转输对电压的依赖性。单个通道的电导不依赖于膜电位；流经每个开放通道的电流依赖于欧姆定律，并有一个固定的电导。相反地，通道开放的可能性与电位是紧密相关的。在 −100 mV 的电位情况下，一个特定通道保持开放状态的时间少于 5%。如果膜去极化至 −70 mV，每个通道保持开放状态的时间接近于 90%。这种行为与假定当通道从闭合转化到开放构象时，n 个电荷移动通过膜相一致。对于重建通道，门控电荷估计是 4 个电荷。与之比较，利用膜片钳方法观察的自然膜中，钠通道的门

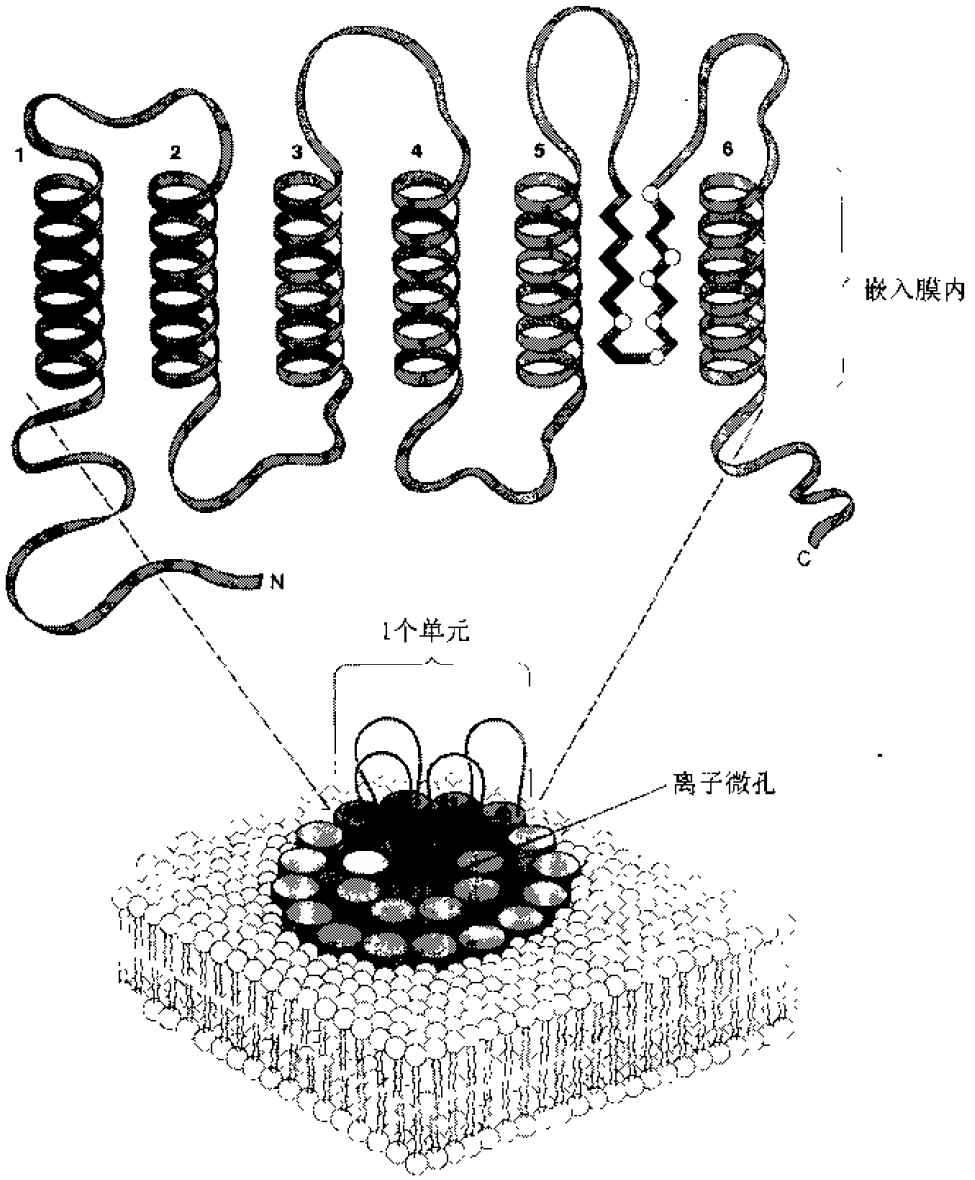


图 6.18　一个对电压敏感的钠通道假设结构示意图

该分子是由 4 个相似的单元组成，每个单元包含有 6 个跨膜螺旋体和 1 个至少构成部分离子微孔的 β 股绞状结构

控电荷将近 6 个电荷。

定点突变和表达方法也被用于探索钠通道的结构和功能。一组实验结果提示，利用单通道记录能够获得非常敏锐的细节。心肌的钠通道受到 Cd^{2+} 离子的瞬间阻塞，导致通道电导的闪烁不定，如图 6.19 所示。在骨骼肌的对应通道中则没有观察到同类效应发生。通道氨基酸顺序的测定结果表明，在心肌通道中存在着一个惟一的半胱氨酸，位于第一个内部重复单元的第五个和第六个假想的跨膜螺旋体之间的环中。在研究其他通道时，这个区域已经被认定为微孔本身的一部分。酪氨酸残基在骨骼肌通道中的所占位置和半胱氨酸在心肌通道中所占位置完全相同。当用半胱氨酸取代自然存在的酪氨酸残基时，骨骼肌通道产生突变。值得注意的是，这种取代产生的一种蛋白质对 Cd^{2+} 的灵敏度与心肌通道对 Cd^{2+} 的灵敏度实际上是一样的，

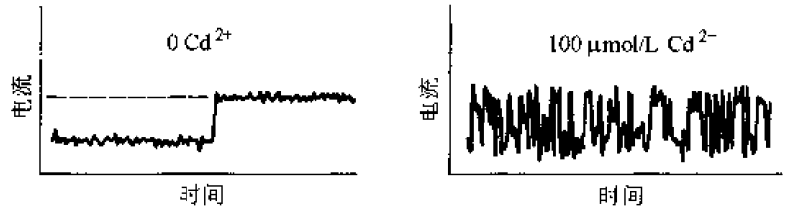


图 6.19　镉离子的瞬间阻塞造成心肌钠通道闪烁图

摘自：P. H. Bachx et al., *Science* 257, 248～251(1992)

如图 6.20 所示。电导的每次持续几毫秒的中断，似乎对应于一个 Cd^{2+} 离子结合一个半胱氨酸残基，或其他邻近基团。尽管这些发现的生理学重要性目前还不清楚，但是它们阐述了这些迷人而重要分子的丰富的生物无机化学内容。

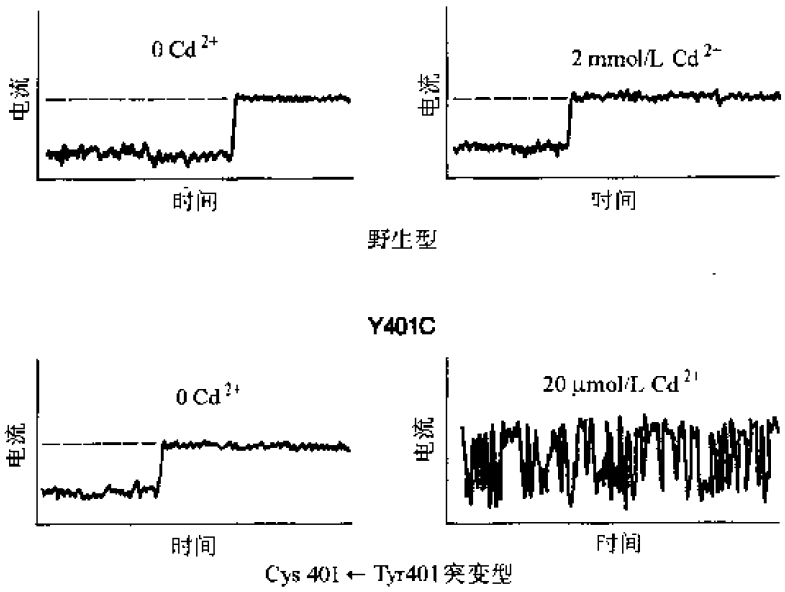


图 6.20　在骨骼肌无序型钠通道的镉诱导闪烁不存在情况下，用定点突变方法引入独特的半胱氨酸残基引起的闪烁图

摘自：P. H. Bachx et al., *Science* 257, 248～251(1992)

这些实例代表了目前几种表征得较好的离子传输体系。包含在多种过程，如视觉、嗅觉和记忆中的信号传导和贮存体系，至少现在已被分别表征。在未来岁月中，更多的有关这些体系功能的分子，以及详细的三维结构特性等信息，将使人们更加深入地了解无机离子梯度在生物中起的基本作用，特别是对 IA 和 IIA 族金属更是如此。

6.4.e　离子通道的合成模型

离子通道好像是极端复杂和奇妙的分子。尽管复杂，产生活性肽为基础模型的离子通道的非常简单的方法，已经证明是成功的。已设计了一个含有 21 个氨基酸的肽，其顺序为

$$NH_2—(Leu—Ser—Ser—Leu—Leu—Ser—leu)_3—CONH_2$$

其目的是合成能够自我组装为一个 α-螺旋单体的聚合物分子，α-螺旋体能够跨越细胞膜并产生能输送离子的微孔。特别需要指出的是，分子模型提示这个肽能够形成六聚体，疏水性的亮

氨酸残基反向排列堆积在一起并且暴露在外侧，在此它们能够与双层类脂的烷基相接触，并且内部微孔内排列有较多的亲水性丝氨酸残基，结构如图 6.21 所示。

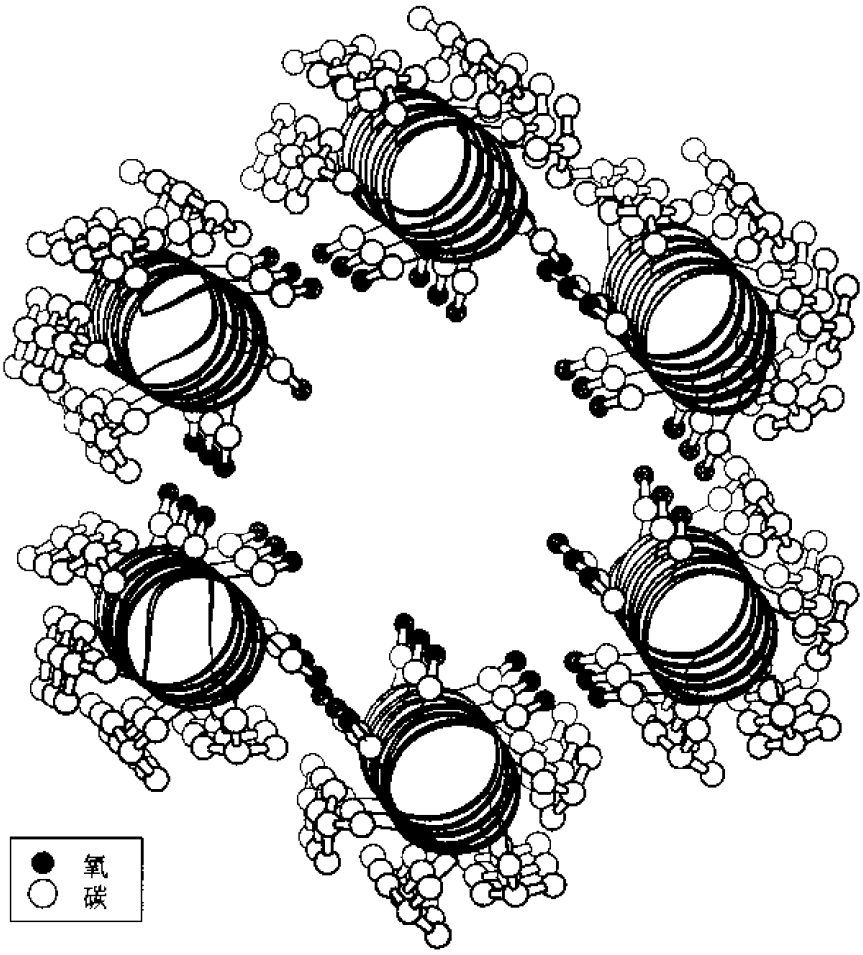


图 6.21　由 21 个氨基酸构成的合成肽聚集形成的六聚体离子通道的推测结构

这个肽被合成、纯化并结合到双层膜中，经过膜传输的离子能够被检测到。观察结果表明，电导的持续几毫秒的逐步增加，非常类似于上面所讨论的单通道电流。进一步研究表明，这种行为是通道形成和阳离子（如钾）穿过双层膜的电导的结果。对于设计类似的十四氨基酸肽，没有观察到这种行为，这可能是因为它没有足够的长度跨过细胞膜。离子选择研究表明，在单价阳离子中，有一个类似于乙酰胆碱受体但又有少许差别的模式。此外，离子通道模型能够传输如三羟甲基铵离子那么大的有机阳离子，但再大些的则不行。这些研究表明，相对简单但设计合理的肽可产生离子通道的活性。它们可以提供在进化的早期历史上，形成离子通道的分子类型的有关信息。

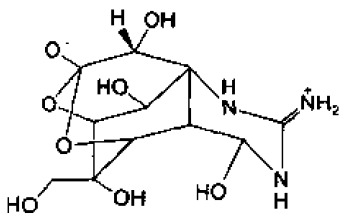
6.5　金属药物分布的组织选择性

控制体内金属离子或配合物的分布，对于以金属为基础的药物是十分重要的。在适当的组织中，药物或造影必须达到有效浓度；而在其他组织中，有尽可能少的非选择性积累。能够说明这个论点的一个重要实例是以放射性金属为基础的造影剂，其中以锝为基础的是最重要的。人

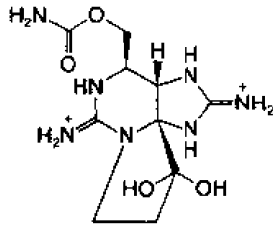
们已经开发了积聚在不同组织中的专一性配合物。例如图 1.8 所示的$[Tc(RNC)_6]^+$是目前应用最为广泛的一种心脏造影剂，它利用了同位素 ^{99m}Tc 的放射活性，该同位素的半衰期为 6 h。人们对它和其他锝放射性药物专一性组织积累的基础目前还不十分了解。但是人们试图用放射金属标记单克隆抗体和其他精心制作的配体，跟踪聚集在专一组织或肿瘤中的放射性金属。此外，随着磁共振造影技术的发展，跟踪特定组织的高度顺磁金属配合物新型试剂正在开发之中。

习　题

1. 假设你准备设计铜的一个生物传输蛋白，为结合蛋白质以及从蛋白质释放出铜，请从不同于铁传递蛋白的角度，提出一个合理的活性部位、外源性辅助因子和化学策略。注意指明氧化态。
2. 在酵母中金属硫蛋白紧密地与铜结合，在高浓度金属离子存在下用于生物体的脱毒。在化学计量近似为$Cu_6(Cys)_8$的簇中，铜的结合形式为 Cu(Ⅰ)。金属硫蛋白基因的表达在转录水平上是受铜浓度调节的。这种调节是通过称为 ACE1(或 CUP2)的一种蛋白的活动完成的。这种蛋白也以一种铜-半胱氨酸簇的形式结合 6～7 个 Cu(Ⅰ)。请提出这样的一种多核簇的形成对于选择性铜离子浓度开关有利的几条理由。
3. 正如在第 5 章所述，尽管许多合成 Co(Ⅱ)配合物显示出非常有利的反应活性，但利用 Co(Ⅰ)的已知生物体系实例是很少的。在发展 Co(Ⅱ)传输体系和 Co(Ⅱ)水平调节体系方面，将会遇到什么样的困难？对于第一过渡系的金属，是否也会产生这些问题？
4. 一个细胞的胞内 Ca^{2+} 浓度为 0.1 μmol/L，胞外浓度为 1 mmol/L，计算 Ca^{2+} 离子平衡电位。将一种激素应用到该细胞的表面导致 Ca^{2+} 从内存中释放出来，使得胞内浓度提高到 10 μmol/L。这个变化是如何影响平衡电位的？
5. 许多神经毒素是通过与离子通道形成分子紧密结合而产生作用的。例如，河豚毒素(tetrodotoxin)和源于一种海洋生物的蚌蛤毒素(saxitoxin)化合物。从如下结构中，推测这些分子中的什么部分对于它们的活性是重要的。

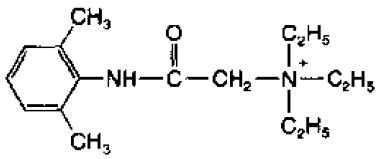


河豚毒素



蚌蛤毒素

6. 许多局部麻醉剂和相关药物对离子通道产生影响。QX-314 就是这样的一种化合物。有意思的是，如果这个化合物被应用到含有电位敏感的钠通道的膜上，几乎观察不到结合或通道电流被阻塞。然而，如果膜被简单地去极化，则结合变得十分强烈，并且电流被更加有效地阻塞。请解释这些观察现象。



参 考 文 献

金属离子的有益作用和毒性效应

P. S. Dobbin and R. C. Hider. 1990. "Iron Chelation Therapy." *Chem. Brit.* 26, 565 ~568.

D. H. Hamer and D. R. Winge, eds. 1989. *Metal-Ion Homeostasis: Molecular Biology and Chemistry: UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology*, Volume 98. Alan R. Liss, New York.

W Mertz. 1981. "The Essential Trace Elements." *Science* 213, 1332~1338.

在严格调节之下的一种有益金属：铁

E. N. Baker and P. F. Lindley. 1992. "New Perspectives on the Structure and Function of Transferrins." *J. Inorg. Biochem.* 47, 147~160.

S. H. Banyard, D. K. Stammers, and P. M. Harrison. 1978. "Electron Density Map of Apoferritin at 2.8 Å Resolution." *Nature* 271, 282~284.

J. L. Casey, D. M. Koeller, V. C. Ramin, R. D. Klausner, and J. B. Harford. 1989. "Iron Regulation of Transferrin Receptor mRNA Levels Requires Iron-Responsive Elements and a Rapid Turnover Determinant in the 3' Untranslated Region of the mRNA." *EMBO J.* 8, 3693~3699.

R. R. Crichton. 1991. *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*. Ellis Horwood, New York.

R. R. Crichton and R. J. Ward. 1992. "Iron Metabolism: New Perspectives in View." *Biochemistry* 31, 11255~11264.

S. Kaptain, W. E. Downey, C. Tang, C. Philpott, D. Haile, D. G. Orloff, J. B. Harford, T. A. Rouault, and R. D. Klausner. 1991. "A Regulated RNA Binding Protein Also Possesses Aconitase Activity." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10109~10113.

E. A. Leibold and H. N. Munro. 1988. "Cytoplasmic Protein Binds *in vitro* to a Highly Conserved Sequence in the 5' Untranslated Region of Ferritin Heavy- and Light-Subunit mRNAs." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2171~2175.

E. W. Müllner, B. Neupert, and L. C. Kühn. 1989. "A Specific mRNA Binding Factor Regulates the Iron-Dependent Stability of Cytoplasmic Transferrin Receptor mRNA." *Cell* 58, 373~382.

T. A. Rouault, C. David Stout, S. Kaptain, J. B. Harford, and R. D. Klausner. 1991. "Structural Relationship Between an Iron-Regulated RNA Binding Protein (IRE-BP) and Aconitase: Functional Implications." *Cell* 64, 881~883.

P. Saltman and J. Hegenauer, eds. 1982. *The Biochemistry and Physiology of Iron*. Elsevier Biomedical, New York.

S. Welch. 1992. *Transferrin: The Iron Carrier*. CRC Press, New York.

一个毒性金属实例：汞

N. L. Brown. 1985. "Bacterial Resistance to Mercury: Reductio ad Absurdum?" *TIBS* 10, 400~403.

M. J. Moore, M. D. Distefano, L. D. Zydowsky, R. T. Cummings, and C. T. Walsh. 1990. "Organomercurial Lyase and Mercuric Ion Reductase: Nature's Mercury Detoxification Catalysts." *Acc. Chem. Res.* 23, 301~308

D. M. Ralston and T. V. O'Halloran. 1990. "Ultrasensitivity and Heavy-Metal Selectivity of the Allosterically Modulated MerR Transcription Complex." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3846~3850.

J. G. Wright, M. J. Natan, F. M. MacDonnell, D. M. Ralston, and T. V. O'Halloran. 1990 "Mercury(II)-Thiolate Chemistry and the Mechanism of the Heavy Metal Biosensor MerR," in S. J. Lippard, ed., *Progress in Inorganic Chemistry*, Volume 38. Wiley-Interscience, New York, 323~412.

金属离子浓度梯度的产生和应用

P. H. Backx, D. T. Yue, J. H. Lawrence, E. Marban, and G. F. Tomaselli. 1992. "Molecular Localization of an Ion-Binding Site Within the Pore of Mammalian Sodium Channels." *Science* 257, 248~251.

A. Brisson and P. N. T. Unwin. 1985. "Quaternary Structure of the Acetylcholine Receptor." *Nature* 315, 474~477.

B. Hille. 1992. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd ed. Sinauer, Sunderland, MA.

J. D. Lear, Z. R. Wasserman, and W. F. DeGrado. 1988. "Synthetic Amphiphilic Peptide Models for Protein Ion Channels." *Science* 240, 1177~1181.

R. J. Miller. 1987. "Multiple Calcium Channels and Neuronal Function." *Science* 235, 46~52.

E. Neher. 1992. "Ion Channels for Communication Between and Within Cells." *Science* 256, 498~502.

E. Neher and B. Sakmann. 1992. "The Patch Clamp Technique." *Sci. Amer.* 266, 44~51.

B. Sakmann. 1992. "Elementary Steps in Synaptic Transmission Revealed by Currents Through Single Ion Channels." *Science* 256, 503~512.

J. C. Skou and J. G. Norby, eds. 1979. *Na^+-K^+ ATPase: Structure and Kinetics*. Academic Press, New York.

R. Y. Tsien and M. Poenie. 1986. "Fluorescence Ratio Imaging: A New Window into Intracellular Ionic Signalling." *TIBS* 11, 450~455.

金属药物分布中的组织选择性

L. G. Marzilli, R. F. Dannals, and H. D. Burns. 1980. "Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Problems, Potential Applications in Nuclear Medicine," in A. E. Martell, ed., *Inorganic Chemistry in Biology and Medicine*. ACS Symposium Series, Volume 140. American Chemical Society, Washington, DC. 91~102.

U. Mazzi, M. Nicolini, and G. Bandoli. 1991. "How a Technetium Complex Becomes a Radiopharmaceutical," in M. Nicolini and L. Sindellari, eds., *Lectures in Bioinorganic Chemistry*. Raven Press, New York, 91~102.

第 7 章　金属离子在生物分子折叠和交联中的作用

7.1　蛋白结构中金属离子的稳定作用
7.2　金属离子对核酸结构的稳定作用
7.3　蛋白质连接到金属结合的 DNA 上
7.4　作为构象探针的金属组装结构

金属在组建三维生物结构方面可以作为模板。与蛋白部位结合时金属离子排除了绝大多数或全部与之配位的水合分子。在与核苷或核酸相互作用时，许多配位水分子保留并帮助维系其结构。由金属结合所形成的三级结构将促使生物大分子间的相互作用。交联的形成对于一些无机元素药物的作用机制是很重要的。金属离子的半径越大、所能提供的配位数越多作用也就越强。

7.1　蛋白结构中金属离子的稳定作用

虽然许多金属蛋白中，金属离子可以促进各种化学反应（见第 9～11 章），但在其他情况下，金属也能起到纯结构性的作用。因为组建生物分子的金属离子，通常为钙和锌，它们无明显光学特征，无机化学家们很难对其作用给予评价。然而，近来的发现表明了这种金属中心在生物学上的重要性。

7.1.a　天冬氨酸氨甲酰基转移酶

天冬氨酸氨甲酰基转移酶（ATCase）催化天冬氨酸与 N-氨甲酰磷酸缩合形成氨甲酰天冬氨酸和无机磷酸酯。这个反应是嘧啶生物合成的第一步。这个酶可被变构调节：加入此合成途径中的终产物 CTP 会降低此酶的活性，而加入作为细胞嘌呤池的一个指标 ATP 将会增加它的活性。这种变构效应，即底物或其他外源分子结合所触发的蛋白亚基间的协同效应或反协同效应如图 7.1 所示。

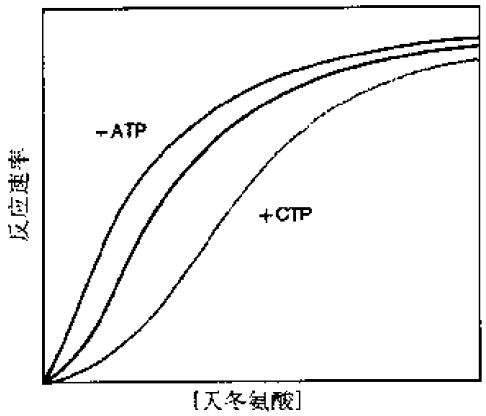


图 7.1　天冬氨酸氨甲酰基转移酶酶活性与变构剂 CTP 和 ATP 的依存关系
在给定的天冬氨酸浓度下，CTP 抑制酶活性，而 ATP 则刺激该酶活性

它的全酶是相当大的，共含有 12 个多肽，6 个拷贝的 302 个氨基酸链的催化亚基，和 6 个拷贝的 154 氨基酸链的调节亚基。它四级结构的部分破坏将导致催化亚基与调节亚基的分离。此酶的催化链形成 2 个含有全部酶活性的三聚体，而调节亚基则形成 3 个含有与抑制剂或激活剂如CTP 和 ATP 结合的二聚体。全酶中含有总共 6 个锌离子，每一个都结合在调节亚基的链上。

ATCase 的这种变构行为由 Monod、Wyman 和 Changeux 首次用一简单的模型给予阐明。这一模型显示，该酶能以两种形式的四级结构存在。一种是紧密型，亦即 T 态(tense state)，它只含有很低的底物亲和性；另一种是松弛型，亦即 R 态(relaxed state)，它含有很高的亲和性。这种状态下抑制剂的效应将促使平衡向 T 状态发展，而活性剂的效应促使平衡向 R 状态发展。

ATCase 的三维结构已由结晶学方法确定有几种存在形式。天然酶的完整结构可见于图 7.2。此结构由 2 个三重轴形排列的催化三聚体，经垂直于三聚体的三重转轴的三个调节二聚体轴架桥所组成。整个分子都是三维对称的。调节链由俩个结构域组成。氨基末端的 90 个氨基酸形成了参与变构反应及二聚体化的结构域。羰基末端的 60 个氨基酸组成了另一个在结构上组织锌离子与 4 个半胱氨酸残基配位的结构域。这一含 Zn 的结构域直接与调节亚基和催化亚基接触。

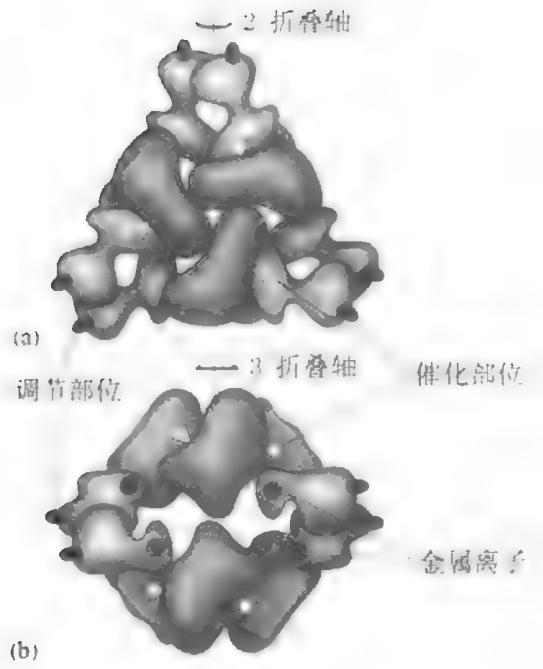


图 7.2　描述催化部位和调节部位的天冬氨酸氨甲酰基转移酶结构

(a) 沿二重对称轴的俯视图；(b) 经由三重对称轴的俯视图
结合的 Zn 离子稳定参与调节亚基和催化亚基间反应的结构域

锌在促使这一反应中的重要性已通过几种方式被证明。在此酶的结构被阐明之前，化学修饰的研究已揭示锌的去除将导致调节亚基与催化亚基的解离。特别是用半胱氨酸修饰试剂对-羟汞苯甲酸(*p*-hydroxymercuribenzoate)在锌敏感性颜料 4-(2-pyridylazoresorcinol)存在下处理此酶。半胱氨酸的修饰可通过检测形成半胱氨酸化汞加和物的增量，而锌的释放则可通过

检测锌-染料配合物的可见光吸收来确定。大约每修饰 24 个半胱氨酸将引起 6 个锌离子从全酶中释放。用超滤法已测出这一过程将引起该酶解离为催化三倍体亚基和调节二倍体亚基。只有当加入锌时，半胱氨酸化汞加和物裂解产生的过量巯基才会引起调节亚基的蛋白部分重新与催化亚基配位结合。这一实验有力地提示了调节结构域的锌-半胱氨酸络合物的存在，这个结论稍后即被结晶学研究所证实。

最近，通过在细菌中得到的已除去氨基末端的调节亚基(即仅由锌结构域组成的亚基)，锌结构域的作用被更直接进行了探究(probe)。这种 9 kDa 的蛋白片段按 3∶1 之比率与催化二聚体形成了紧密的复合体。非常有趣，这一复合体的形成是协同性的，用锌结构域对催化亚基滴定没有发现中间体的存在。这一复合体很容易被汞制剂破坏，但是，如上所述用巯基和锌处理后仍可使它复性。它与天冬氨酸的亲和性是天然分离的催化亚基的两倍，而 V_{max} 则有所降低。这些性质都与该酶在 R 态时的推理惊人地吻合。可见，锌能促使小蛋白结构域的形成，继而结合催化亚基，使其完成类 T 态(T-like state)向类 R 态(R-like state)的转变。

7.1.b 核酸结合蛋白中的锌结构域

维系生物高分子结构的锌离子被发现广泛存在于核酸结合蛋白及基因调节蛋白中。这一系统的特征性鉴定始于转录因子 ⅢA(transcription factor，TFⅢA)的发现。TFⅢA 是特异定位的 DNA 结合蛋白，它在调控非洲爪蟾蜍(*Xenopus*)的 5S rRNA 基因转录中起着决定性作用。这一蛋白中锌的作用是由以下两个实验路线所证实。首先，如从爪蟾蜍卵母细胞中分离的蛋白作为与 5S RNA 络合的一部分被发现含有 2～3 个等价的锌。在用 TFⅢA-5S rRNA 配合物对含螯合剂 EDTA 的溶液作透析时发现这些锌离子并不会失去。但是，一旦在透析前先用 RNA 酶处理以破坏 RNA，则这些锌离子可被透析除去。其次，实验证明这些结合的锌离子对于 DNA 的特异结合是至关重要的。从 5S rRNA 配合物中分离出的 TFⅢA，如果含有锌离子，那么它可以和一段约含 45 个碱基对的 DNA 片段结合并且可以保护这一片段免受核酸酶的降解；但是，一旦通过 EDTA 的螯合作用去掉锌离子，则这种特异结合作用也就丧失了。此时若是补加锌离子，这种活性又可恢复，但补加其他相同浓度(15 μmol/L)离子 (Co^{2+}、Ni^{2+}、Fe^{2+} 和 Mn^{2+})并没有这种效果。

根据 cDNA 的核酸序列分析推演出的 TFⅢA 氨基酸序列，人们提出了这些蛋白依赖锌离子的 DNA 结合模式。在序列靠近 N 端¾的位置上发现了 9 个连续的序列，它们都含有大致相同的保守性：

$$(Tyr,Phe)-X-Cys-X_{2,4}-Cys-X_3-Phe-X_5-Leu-X_2-His-X_{3,4}-His-X_{2-6}$$

其中 X 代表可以变化的残基。该序列中含有 2 个半胱氨酸和 2 个组氨酸，它们都具有能够螯合锌离子的侧链。进一步，在没有螯合剂的条件下纯化出的 TFⅢA-5S RNA 配合物中，每一蛋白分子含有 7～11 个锌离子。由以上的结果推测，这 9 个序列中的每一个都围绕着锌离子而形成一个结构域，其中的锌离子是与半胱氨酸和组氨酸螯合在一起的。这些结构域被称作锌指结构。图 7.3 是这种结构的示意图。

很多实验结果都支持这一推测。通过 EXAFS 的方法，可以直接对与锌离子作用的配体进行标记。对 TFⅢA-5S RNA 配合物进行的 EXAFS 研究表明：两个硫原子的距离为 2.30 Å，而两个氮原子的距离为 2.00 Å，这一结果符合预测的结构。关于金属结合部位的结构以及这些结构的相对独立性的研究，可从对仅含有一个锌指的多肽的研究中获得。已经制备并纯化了一

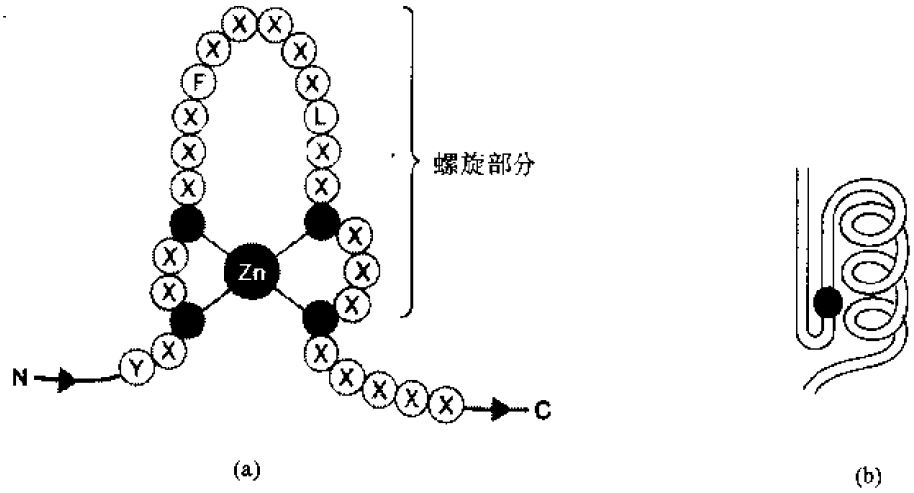


图 7.3　转录因子 TF Ⅲ A 和相关蛋白上的锌指结构域的氨基酸序列和平面结构(a)以及这些结构域结合上锌离子后的三维结构(b)

段相当于 TF Ⅲ A 的第二个锌指结构域的多肽，这个多肽可以结合等摩尔的 Zn^{2+} 或 Co^{2+}。对含有钴离子的配合物所作的吸收光谱包括了在可见光区的条带，而且摩尔消光系数大于 $500(mol/L)^{-1} \cdot cm^{-1}$，这一结果再与合适的模型相比较，可以推论与金属离子结合的配位数是 4。对没有金属离子存在下的多肽进行圆二色性光谱(CD)分析，发现缺乏完整的结构；而补加一定量的二价锌离子或钴离子会引起 CD 光谱的明显变化，提示锌指结构得以重建；最后，在蛋白酶的作用下，发现外加的锌离子能够使多肽对胰蛋白酶变得不敏感。

这种单一结构域的多肽在研究锌指结构的金属结合特异性上也是很有用的。上面提到，除了锌离子外，这种多肽还可以定量结合 Co^{2+}。进一步的研究证实 Fe^{2+} 和 Ni^{2+} 也能与之结合。通过金属离子滴定实验可以测定一系列金属离子解离常数，结果显示 Zn^{2+} 的结合强度是其他离子的 $10^3 \sim 10^5$ 倍。这一结合强度上的差异也可解释为什么不同金属离子在恢复 EDTA 处理过的 TF Ⅲ A 的 DNA 结合活性上的差异。

在发现 TF Ⅲ A 中含有锌指序列后不久，在其他蛋白中也发现了类似的重复序列。如酵母转录因子 ADR1，它含有 2 个连续的锌指序列；果蝇发育调控蛋白 Krüppel，它含有 5 个这样的序列。在随后的几年里，有大量的 DNA 序列被鉴定编码重复的锌指结构域。推测人的基因组中可能含有 500 个基因用来编码这类结构域。在一个蛋白质中所含有的锌指结构域数目变化较大，从 1～37 个都有报道，其中的一些总结在图 7.4 中。实验表明，这些含有锌指结构的蛋白都具有序列特异的 DNA 结合活性。

应用 NMR 的方法，可以通过含单一锌指结构的多肽来确证锌指结构域的三维结构，这些多肽仅仅含有 25～30 个氨基酸，但是它们仍可以在溶液体系中折叠。最初的研究是来自 ADR1 上的一个结构域。在一维光谱中清楚地显示，多肽经历了从没有锌离子存在的无序结构到补加锌离子后的有序结构的转变。二维的检测方法通过测定邻近氢原子的距离来考察蛋白的整体结构。在其他一些多肽中也进行了类似的研究。图 7.5 显示了一个推测的结构，二个半胱氨酸形成一个发夹转角结构，其后是一段 α-螺旋。这一结构有一个明显的特征，即每一个结构域的氨基端和羧基端彼此相距较远；这一结果暗示当蛋白与 DNA 结合时，连续的锌指结构可能是缠绕在 DNA 上的。鼠转录因子 Zif268 含有 3 个连续的锌指结构，它们可特异结合在一

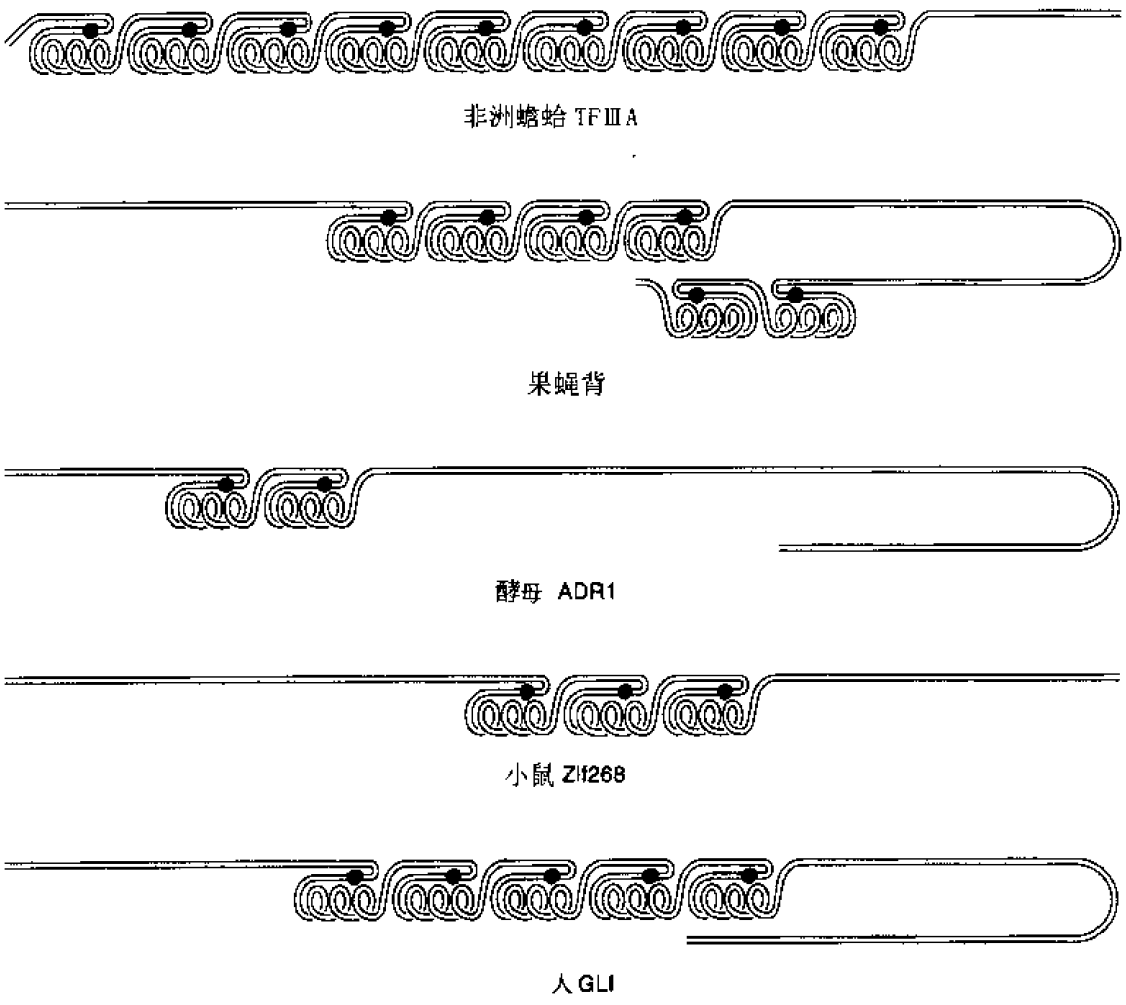


图 7.4　几种蛋白中的锌指结构的数目及在一级序列中的位置

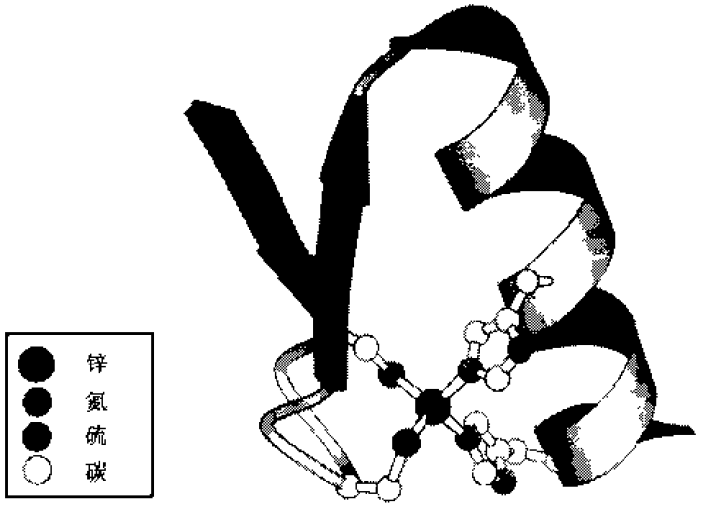


图 7.5　通过 NMR 的方法推测的单一锌指结构域的三维结构以及
2 个半胱氨酸和 2 个组氨酸与锌离子整合的情景

段 DNA 序列上，对这一蛋白进行的 X 晶体学分析证明了上述的锌指结构以及锌指结构域与 DNA 作用的模式。图 7.6 示出了这一结构。

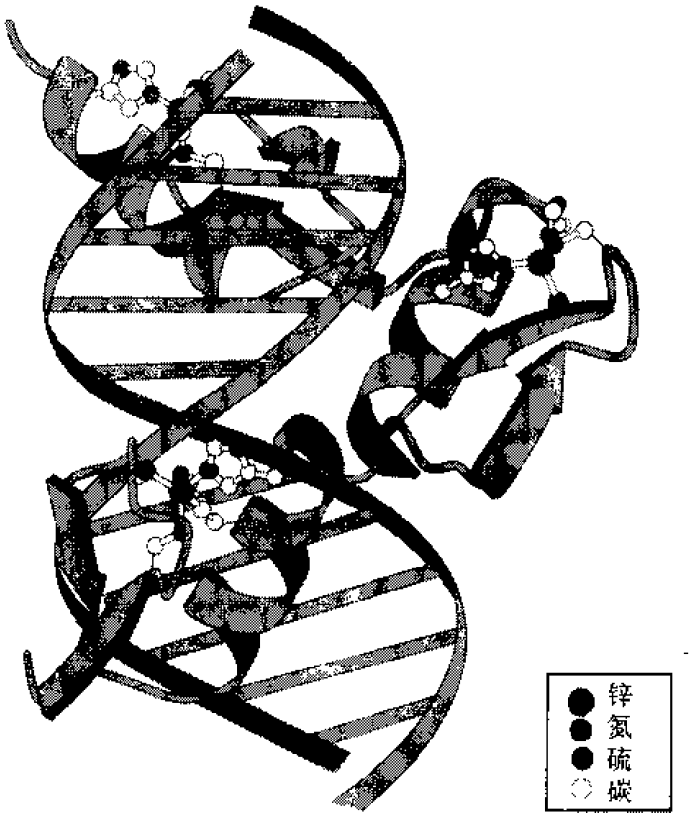


图 7.6　鼠转录因子 Zif268 的三个锌指结构域与 DNA 结合的示意图

除了含有与 TF ⅢA 中序列相类似的这一大族蛋白外，又鉴定出其他类型的核酸结合蛋白，它们也含有成对的半胱氨酸和组氨酸，推测也具有金属结合的结构域。其中包括胆固醇受体超家族的成员，它们具有一个约含 66 个氨基酸的结构域，其中包含了 9 个保守的半胱氨酸。这些半胱氨酸组织成 2 个相对独立的功能单位，每一个功能单位含有一个与 4 个半胱氨酸螯合的锌离子。已通过 NMR 技术和晶体学的方法确定了这些结构域的三维结构。一个有趣的性质是，单一的锌离子结合的功能单位在 DNA 识别中并不十分重要，但是在诱发蛋白质的二聚合方面却发挥重要的作用。

另一个蛋白家族是酵母基因调节蛋白 GAL4，它含有 $Zn_2(Cys)_6$ 结构。通过 NMR 和 X 线晶体学方法也已确定了它的结构。GAL4 中含有锌离子的最初证据来自遗传学研究。在一株 GAL4 基因发生突变的酵母中，GAL4 的基因调节活性仅当在培养基中补加锌离子后才能恢复。这一突变株是将保守的脯氨酸变为亮氨酸，结构分析表明原来的脯氨酸是处于顺式肽键的构象，这种构象有利于脯氨酸处于肽键的氨基端。看来突变的 GAL4 对金属离子的亲和力下降，是因为缺乏脯氨酸提供的顺式肽键。

另一个家族是反转录病毒的核衣壳蛋白，它们具有 1～2 个金属结合序列，这些序列包括 3 个半胱氨酸和一个组氨酸。NMR 研究证实了这些结构域的三维结构。EXAFS 实验证明在完整的反转录病毒颗粒中含有锌离子。因为每一个这样的病毒颗粒大约的直径为 50 nm，并且包含约 1000 个拷贝的核衣壳蛋白，因此病毒内部的锌离子浓度接近 1 mmol/L。

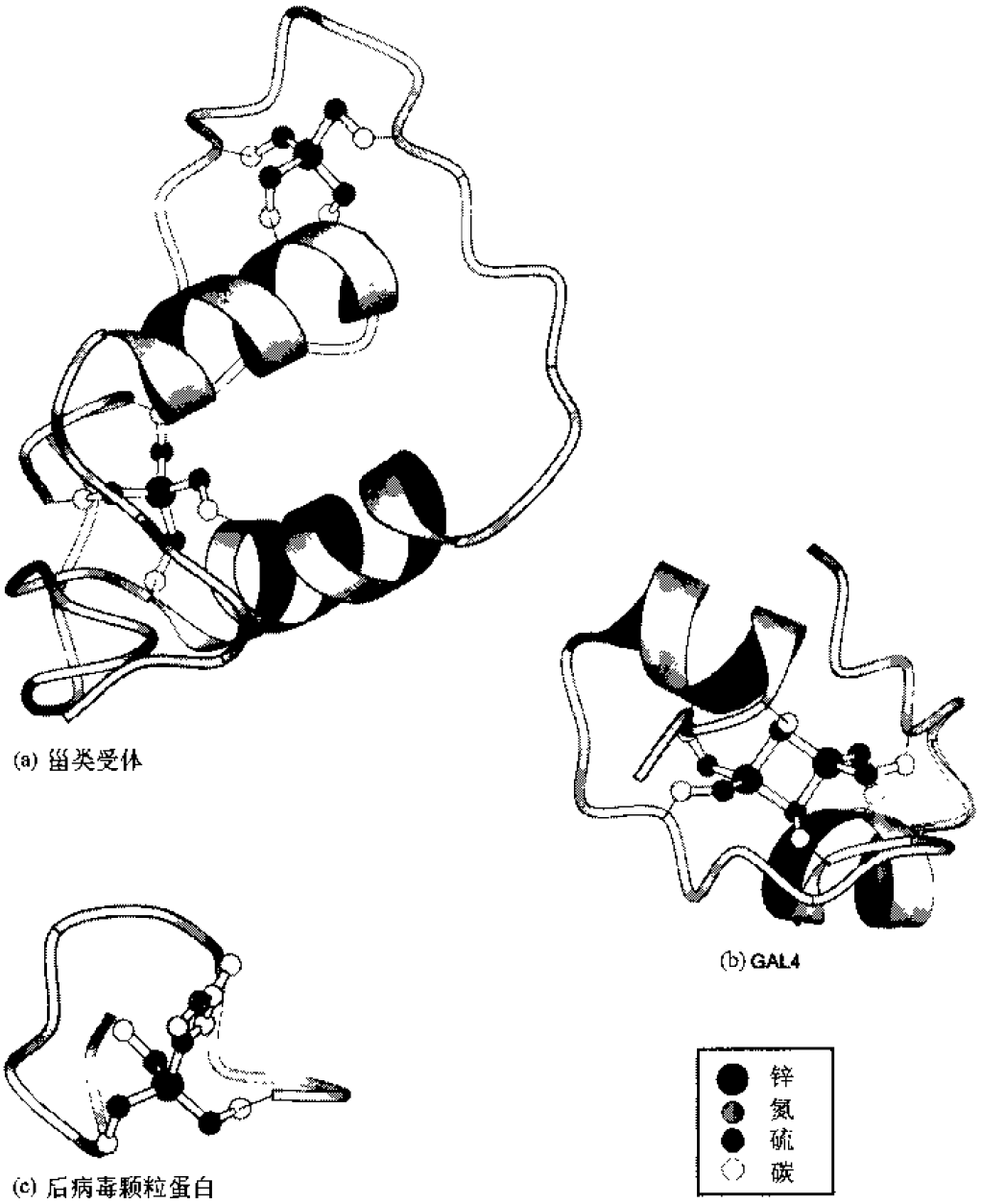


图 7.7　一些核酸结合蛋白中的锌离子结合结构域的结构

在这些功能特异的蛋白家族中，结合锌离子的结构域是很不同的，如图 7.7 所示。在所有这些蛋白中，已经证明锌离子的结合会引起蛋白的结构发生变化并使其得到稳定的作用。很清楚，对大分子之间的相互作用来说，自然界利用金属离子的配位能力产生或稳定其结构是非常重要的。

此外，锌的结合可能调节与核酸的结合，进而调节基因的表达。正如在第 5 章和第 6 章中所讲，一些对金属诱导的基因调控蛋白已经鉴定出来。也许，锌离子仅仅是这些蛋白中的结构分子，抑或它同时又是基因调控网络中的信息分子或信使。时间将说明这一点。

7.1.c 钙结合蛋白：结构互变稳定作用

很多信号传导过程涉及到Ca^{2+}的释放。细胞内Ca^{2+}浓度的升高可以被一类钙结合蛋白感知。这类蛋白家族中的一个典型代表是钙调蛋白，它将体内钙浓度的变化与很多酶的活性状态偶联起来，如蛋白质激酶、NAD激酶、磷酸二酯酶和Ca^{2+}泵ATPase。

钙调蛋白是一条多肽链，它包含148个氨基酸，可以结合4个Ca^{2+}。钙调蛋白的一级序列在不同物种中是非常保守的。它含有4段在其他钙结合蛋白中存在的序列，这些序列的结构已经通过晶体学的方法得以确证，首次观察到的结构是在小白蛋白(parvalbumin)中，并且命名为EF-手(EF-hand)[①]，这里，E和F代表α-螺旋。这一结构包括一段由约10个氨基酸组成的α-螺旋，一个10个氨基酸组成的环，和第二个α-螺旋。以下是小白蛋白中的2个钙结合EF-手的序列和4个钙调蛋白的相关序列。

ADDVKKAFAII **D** Q **D** K **S** GF **I** EED **E** LKLFLQNFKA

DGETKTFLKAG **D** S **D** G **D** GK **I** GVD **E** FTALVKA

IAEFKEAFSLF **D** K **D** G **D** GT **I** TTK **E** LGTVMRSLGQ

EAELQDMINEV **D** A **D** G **N** GT **I** DFP **E** FLTMMARKMK

EEEIREAFRVF **D** K **D** G **N** GY **I** SAA **E** LRHVMTNLGE

DEEVDEMIREA **N** I **D** G **D** GQ **V** NYE **E** FVQMMTAK

黑体字母表示与钙结合的位置。这些残基是通过侧链的羧基，羟基或酰氨基的氧或是肽链骨架的集团与钙结合的。EF-手结构域是成对出现的，当一个EF-手序列与一个钙结合时，这一对EF-手的两个会通过非极性侧链互相堆积在一起。图7.8是钙调蛋白中2个EF-手单位的一个的结构示意图。更详细的结构，包括钙离子周围的螯合环境，示于图7.9。

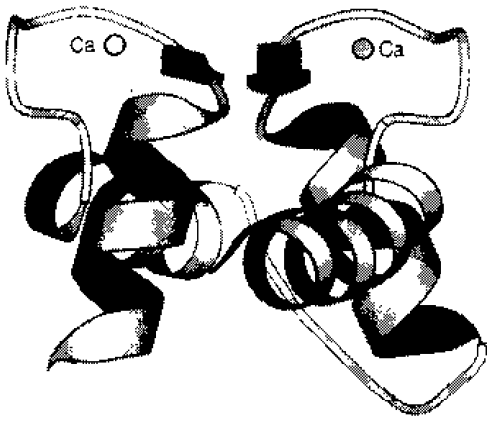


图7.8 一对EF-手结构域的示意图

显示Ca结合环区和两个结构域相互的堆叠

每一个钙离子的配位数是7，分别是和3个天门冬氨酸或天门冬酰胺、1个谷氨酸、1个肽键的羰基和1个水分子。这些结合部位对金属的特异性是很重要的。钙反应蛋白必须能在其

① 由29个氨基酸组成的钙结合基序，含E、F两段螺旋，并形成螺旋-环 螺旋结构。

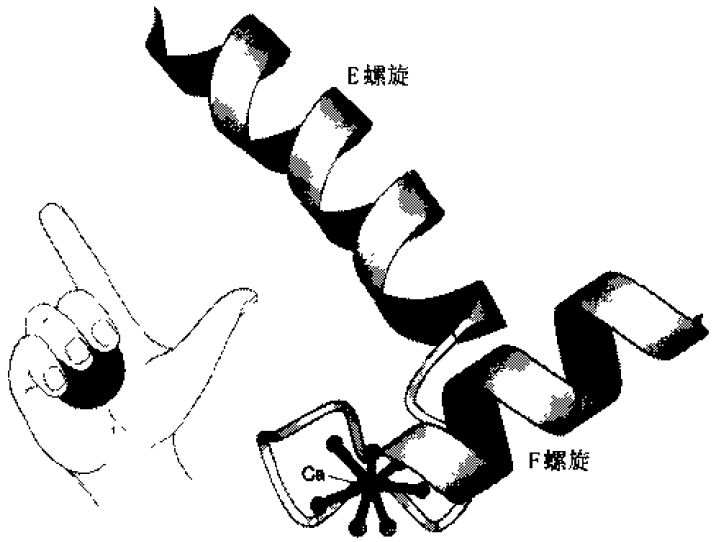


图 7.9　EF-手结构域的结构

结构显示了 E(食指)和 F(大拇指)螺旋和 Ca 结合部位的位置

(图中还示出 7 个和钙结合的氧原子,它们来自氨基酸侧链、肽链骨架和水)

他高浓度的离子,如镁离子溶液中特异地识别钙离子。EF-手的这种高配位数结合更有利于对钙而不是镁的结合,因为后者相对较小。对于钙调蛋白而言,Ca^{2+}的解离常数大约在 10^{-6}～10^{-7}mol/L,或更小;而镁的解离常数约为 10^{-3}mol/L。

通过 X 射线晶体学方法,已经知道了钙调蛋白的结构,如图 7.10 所示。整个分子呈现为哑铃形:一段长而暴露的 α-螺旋将 2 个 EF-手结构域连接起来。这段螺旋是由 F 结构域 2 的 F 螺旋延伸与结构域 3 的 E 螺旋直接相连。在钙调蛋白和肌钙蛋白 C 中出现的这样一段长而暴露于溶液中的 α-螺旋是很少见的。这段螺旋看来是通过在其上的 i 和 $i+4$ 位置的带正电氨基酸(lys, arg)和带负电氨基酸(asp, glu)之间的盐键而得以稳定的。下文中还会讲到,这种螺旋必须是亚稳定的,因为当钙调蛋白与靶分子结合后,这段蛋白应当发生合适的构象变化。最后一个值得注意的方面是在哑铃的两个球部表面有大块的疏水表面。这些疏水块被高度负电势的区域所围绕。

正如早已提到的,钙调蛋白能够调节很多酶的活性,钙调蛋白与它的靶分子结合的非常牢,解离常数通常为 10～100 nmol/L 或更小。这两个事实表面上似乎有些矛盾,因为这很难理解它可以和那么多的底物结合而每一种结合都具有如此高的亲和力。目前已经从蛋白质结构的角度解释了这一疑问。钙调蛋白能够与多肽结合,并且能够形成高亲和力的碱性,双亲或 α-螺旋结构。对这些与钙调蛋白结合的多肽所进行的序列分系和突变研究以及化学方法都显示与钙调蛋白结合的区域是很小的,大约有 20 个氨基酸,它们具有正电荷并能形成双亲的螺旋结构。图 7.11 给出了一些例子,显示这些部位以及模型多肽的序列,它可以和钙调蛋白很牢固地结合。应用荧光漂白和亲和成像标记技术表明多肽的疏水部分在与钙调蛋白作用时有部分的包埋。进一步,双标记多肽实验揭示这一多肽的两端能够与钙调蛋白的两个结构域同时发生反应。这一结论有些令人吃惊,因为在保持中间的连接 α-螺旋不被破坏的情况下,两个疏水面发生反应是不大可能的。

由以上的这些结果可以推测,中间的螺旋在结构上一定是具有较好的柔性的,钙调蛋白的

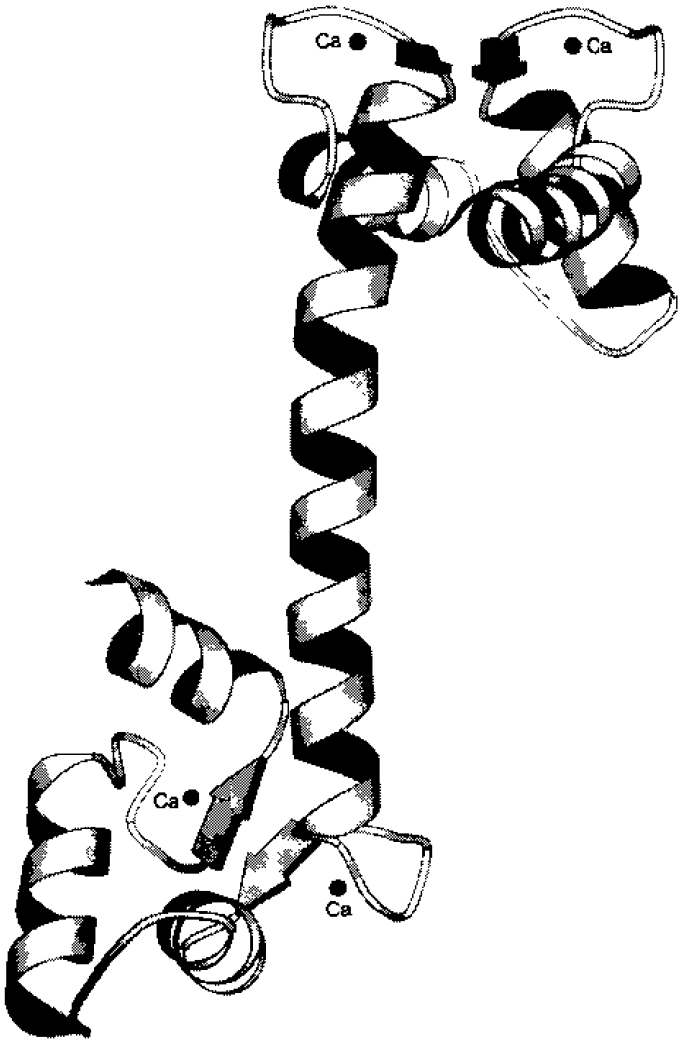


图 7.10　通过 X 射线晶体学方法确定的钙调蛋白结构

两个球型结构域通过弯曲来与靶分子结合。对这些部位的光偶联实验揭示了另一个重要的结果，蛋氨酸往往是这一修饰的残基。通过对疏水表面的性质分析提供了一个简单的解释：在疏水表面的可及表面中，有大约 50%是由 Met 提供的。这一结果的重要性在于 Met 是一种疏水氨基酸而且是不分支的，因此具有较好的柔韧性。关于能以高亲和力与不同的靶分子结合这一费解问题的解释，关键可能在于能够和钙结合的球体的疏水表面，而这两个球体彼此又通过一个柔性区连接起来。

以上的这一假说已经通过对两个钙调蛋白-靶分子配合物的结构研究得以证明。图 7.12

骨架肌球蛋白轻链激酶	K R R ■ K K N ■ I A ■ S A ■ N R F K K ■ S S
光滑的肌球蛋白轻链激酶	R R K ■ Q K T ■ H A ■ R A ■ G R L S S ■
钙调蛋白激酶	R R K ■ K A A ■ K A ■ V A ■ S R L G
钙泵	Q I L ■ F R G ■ N R ■ Q T ■ I K V V N ■ S S

图 7.11　一些受钙调蛋白激活的蛋白质中与钙调蛋白结合部位的氨基酸序列

显示了其中一个配合物与自由状态的钙调蛋白在结构上的比较。来自于骨骼肌肌球蛋白轻链激酶的一段含 26 个氨基酸的多肽能够与钙调蛋白结合，对这一结合物应用了 NMR 方法进行了分析。用^{13}C和^{15}N对钙调蛋白作了均匀标记，这有利于通过核之间的偶联来区分蛋白与蛋

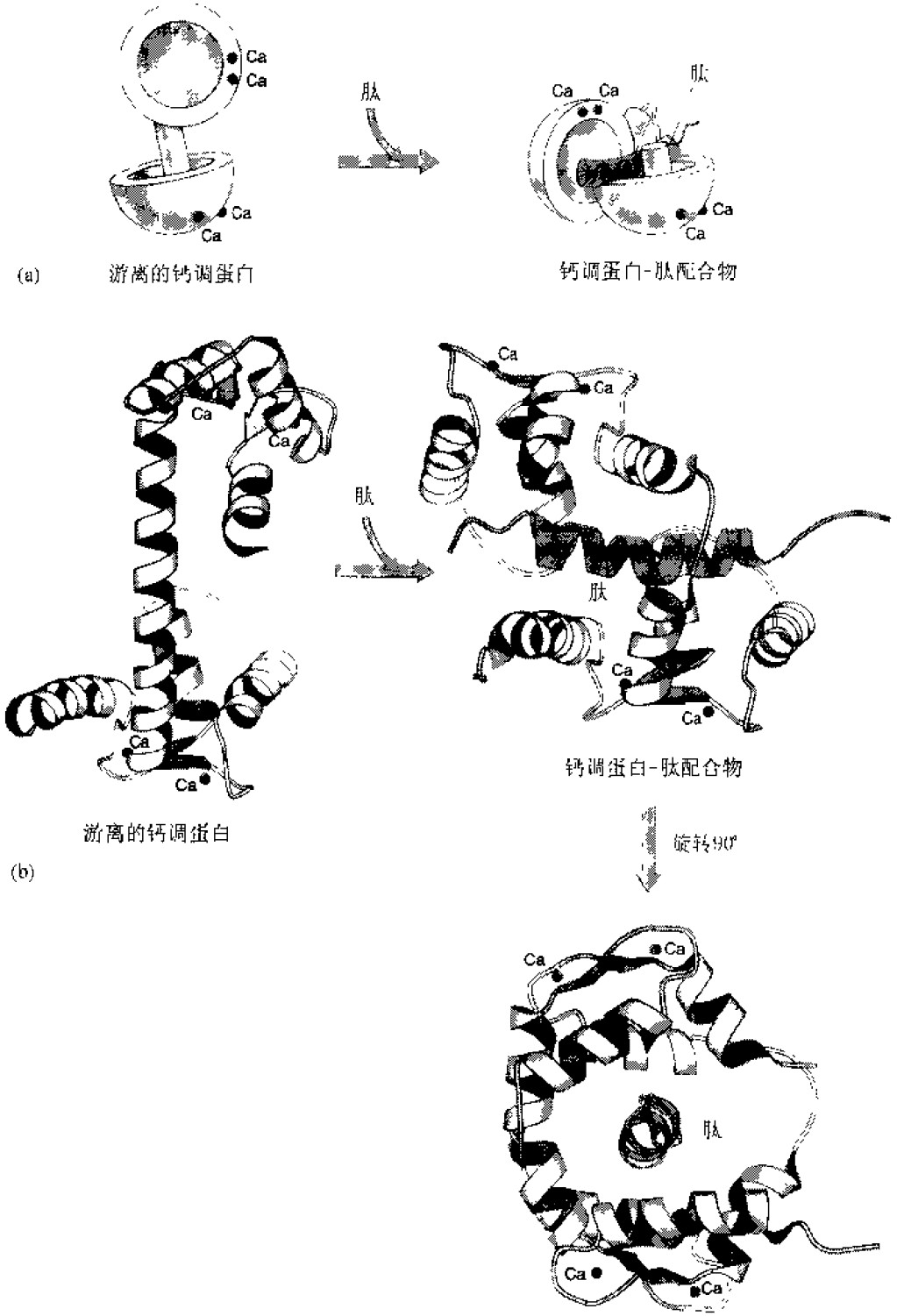


图 7.12　钙调蛋白与靶分子结合而引起的结构变化

(a) 一种简略的图示；(b)通过 NMR 分析而显示的较为详细的图示

(注意，靶分子是如何与钙调蛋白作用进而引起长的中央螺旋发生构象变化的)

白，蛋白与多肽之间的相互作用。这一配合物是迄今用 NMR 分析的最大的结构。另外一个用 X 射线晶体学方法分析的配合物是来自平滑肌肌球蛋白轻链激酶的一段含有 20 个氨基酸的多肽与钙调蛋白的配合物。这两个多肽显示了一些相同的特征，包括类似序列

$$Trp-X_5-Ala-Val-X_5-(Phe, Leu)$$

Trp 和邻近的氨基酸与钙调蛋白羧基端的球体上的疏水口袋结合，(Phe，Leu)区则与氨基端的疏水口袋结合，Ala-Val 区域则与连接球体的螺旋区反应。与球体上的 Met 相接触的位点也已观察到。每一个配合物在结构上呈现二轴对称，在游离钙调蛋白中的螺旋则呈现为弯曲状态。

现在我们来看一下钙离子在这一过程中的作用。已通过大量的光谱学实验和化学标记实验证实钙与钙调蛋白的结合会引起钙调蛋白明显的结构变化。尽管对完全脱钙和部分结合钙的钙调蛋白的结构知之尚少，但有一点是清楚的，即 EF-手功能单位所组建的球体的构象和刚性在很大程度上是依赖于钙的结合。上面提到的疏水表面在钙结合前是不存在的，这样就排除了它们与靶分子的作用。通过这种途径，当细胞内钙离子浓度增加到足以使钙调蛋白与钙结合的浓度时，引发了钙调蛋白的结构的变化，导致钙调蛋白与靶分子的结合进而导致靶分子的活化。

目前关于细胞内钙浓度变化的证据已经得到。最直接的证据来自应用膜穿透性的钙结合染料，如 Fura 2。这些染料的作用基础如图 7.13 所示。作为应用这种染料的一个例子，让我们来考查一下用肾上腺素能药物 α-羟基-β-甲胺基间羟基乙苯 (phenylephrine) 处理鼠脑血管平滑肌细胞的效应。在处理前，通过在 350 nm 和 385 nm 处的荧光激发，染料 Fura-2 显示细胞内的钙离子浓度为 150 nmol/L。加入10 mmol α-羟基-β-甲胺基间羟基乙苯，导致细胞内钙离子的水平升高了 0.5 mmol/L。钙离子被认为是一种第二信使；第一信使即在细胞表面药物浓度的增加，转化为钙浓度的增加，后者通过钙调蛋白和其他钙结合蛋白的作用来影响细胞内的代谢过程。

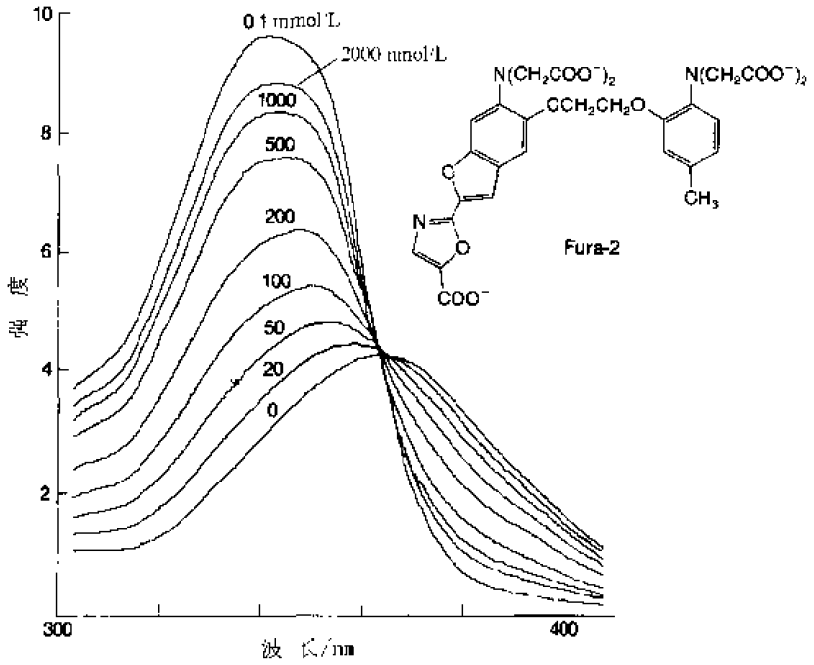


图 7.13　钙结合染料与钙浓度的关系

7.2 金属离子对核酸结构的稳定作用

核酸是多聚负电荷，因此它需要相反的电性来稳定结构。这些相反的电荷被用来部分或全部中和磷酸集团的负电荷，以便电脉冲不会引起不良的结构变化。这种电性中和的任务是通过一些非特异的配合物来完成的，这些配合物含有 Na^+、K^+ 和 Mg^{2+} 或是通过精胺上的带正电的聚胺来实现。在有些情况，特异性较好的金属结合部位已经被鉴定出来。以下讨论一些有代表性的例子。

7.2.a 转运 RNA

对 RNA 的结构了解的比较清楚的是各种类型的 tRNA。这些 tRNA 分子，正如在 3.2b 中所讨论的那样，含有约 80 个碱基，并且折叠成 L 型结构。金属与 tRNA 的结合作用被详细研究过，无论是着眼于金属对 RNA 的稳定作用，还是在 X 射线晶体学研究中制备重金属衍生物。图 7.14 显示了酵母 Phe-tRNA 与金属离子结合的位置。

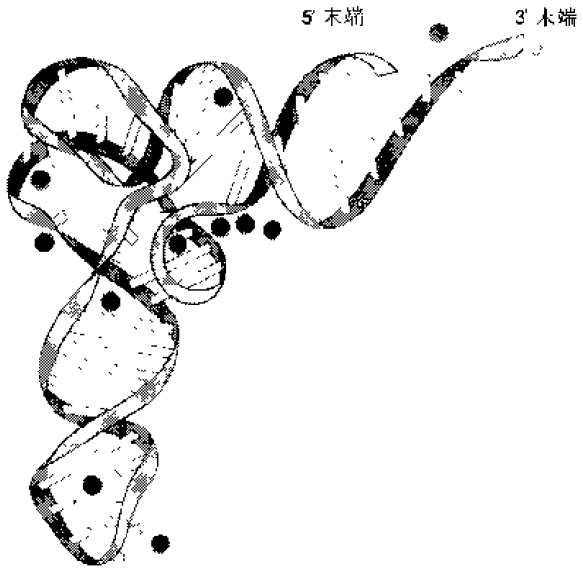


图 7.14 通过 X 射线晶体学方法确定的几个 tRNA 上的金属结合位点

对稳定结构有重要作用的部位是能被 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 占据的位置，尽管这两个位置在结构上并不完全一致。在溶液中进行的结构稳定性的测量，显示这些位点在 D 环和 T 环上(图 3.14)。

图 7.15 显示了通过 X 射线晶体学的方法所确定的 Mg^{2+} 的结合位置。

在前述讨论的蛋白质中，金属结合部位与核酸结合部位之间存在着重要的关系。在蛋白质中，金属离子往往是接近或完全脱水的，它的所有液相中存在的水分子都被蛋白质的侧链所取代。相反，在 tRNA 和其他的一些核酸分子中，大多数的水合分子仍然保持配位作用，仅仅有 1 个或 2 个核酸的侧链集团与金属离子直接结合。水分子占据的螯合位点对金属离子的结合特异性仍然是很重要的，因为它们介导核酸上的磷酸和其他基团之间的氢键的反应。

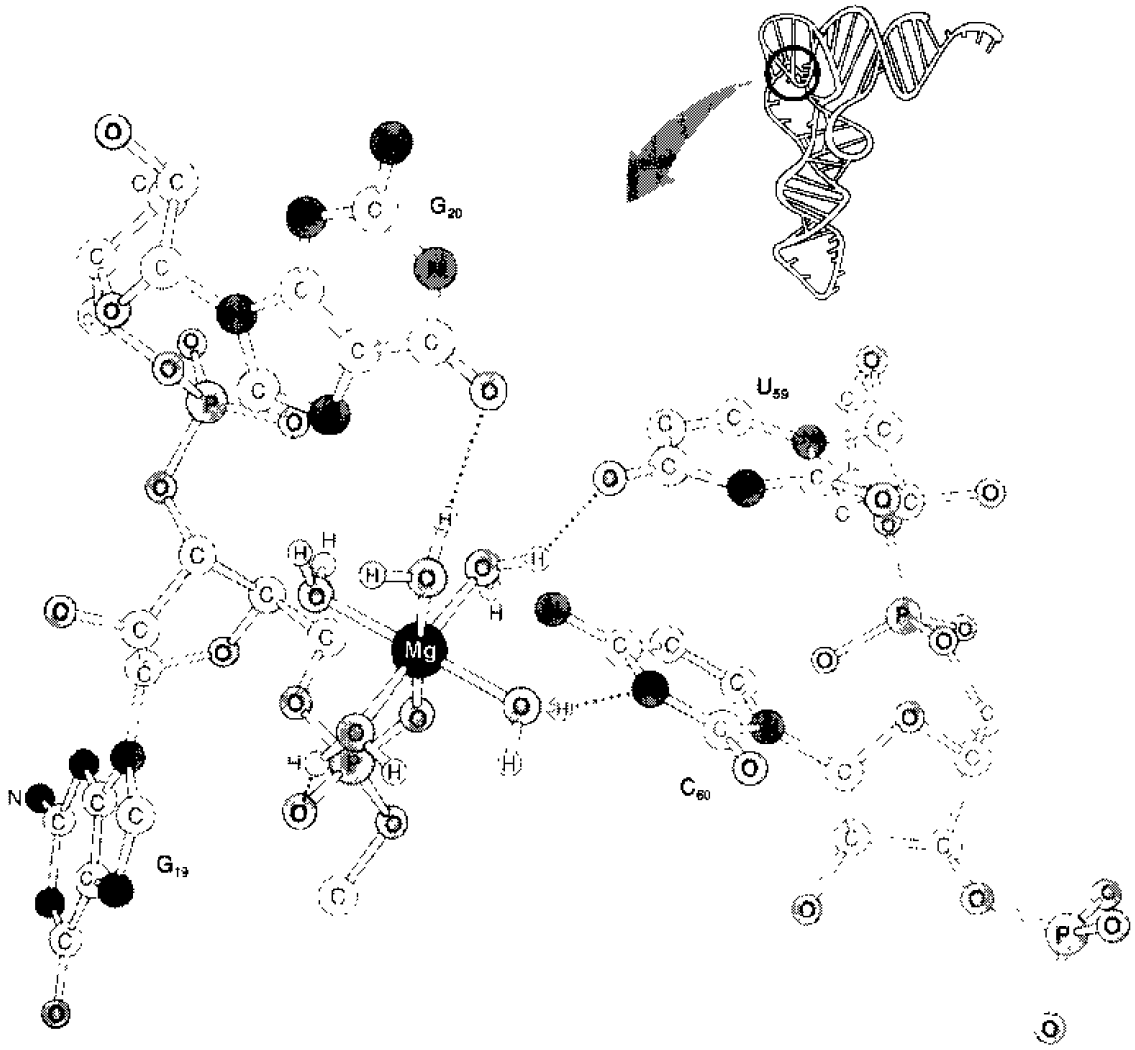


图 7.15　酵母 $tRNA^{Phe}$ 上的 Mg^{2+} 结合位点的结构

7.2.b　RNA 分子的催化活性

近年来一个最重要的发现是某些特定的 RNA 分子能够在有些生化反应中起到催化剂的作用。已经有一些不同的具有催化活性的 RNA 分子，或称核酶(ribozyme)，被鉴定出来，并且在进行结构与功能的研究。在这些分子中的金属离子的作用也在研究中。现在已经明确金属离子是通过两种途径发挥作用：通过稳定 RNA 的结构和通过参与化学反应。从四膜虫 *Tetrahymena thermophila* 中来源的一个能自切割的内含子是目前广泛研究的一个例子，图 7.16 显示了它的二级结构。这个 RNA 分子在缺乏 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的情况下是没有活性的。其他的离子如 Ca^{2+}、Ba^{2+} 和 Sr^{2+} 能降低 RNA 分子对 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 的需要，但单独的任何离子均不能产生有催化活性的分子。应用目前发展起来的一项技术——羟基放射印迹技术(hydroxyl radical footprinting)，即通过标记 RNA 的四级结构，来直接跟踪这些离子的不同作用。这种方法以前曾用于研究 DNA 分子(见 11.4.c 节)。在这种方法中，羟基的放射性是通过 Fe^{II}(EDTA)和过氧化氢来对 RNA 进行切割和放射标记的。切割位点可以通过检测凝胶电泳经放射自显影后显示的切割片段的大小来确定。在不同位置的切割速率依赖于分子的折叠结构。应用这

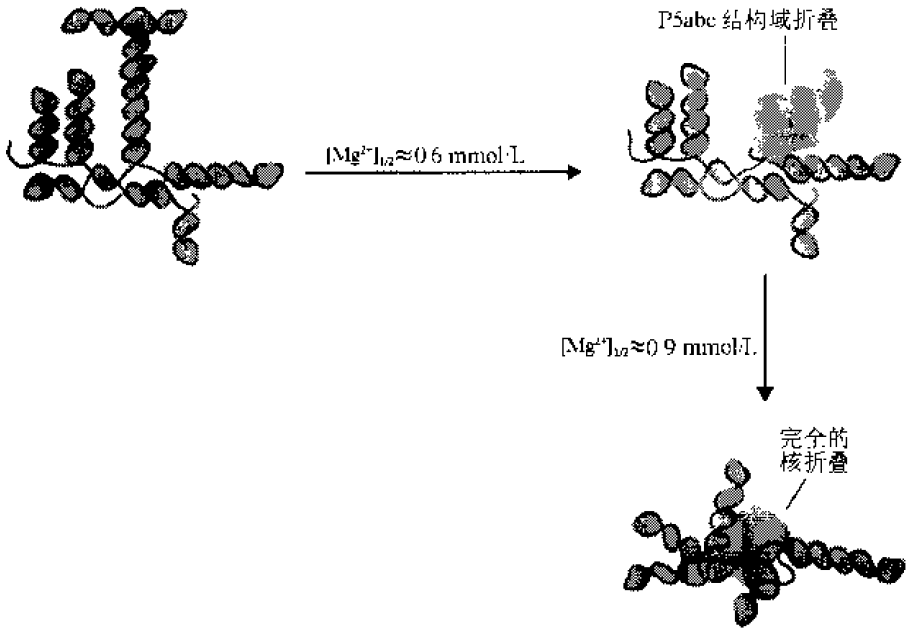


图 7.16　四膜虫的一种可自切割的内含子在结合 Mg^{2+} 后的折叠样式

一方法已经证明1 mmol/L的 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 能够产生完全折叠的分子，这种分子不会像没有折叠的RNA 分子那样被切割。尽管通过羟基放射切割保护实验证明 Ca^{2+} 结合的分子与 Mg^{2+} 结合的分子具有几乎一样的结构，但是前者不具有催化活性，当补加了 Mg^{2+} 后则可诱导出催化活性。因此，Mg^{2+} 对于核酶具有独特的作用。在 RNAase P 和“锤头”核酶中，也观察到金属离子的这种双重作用。

7.2.c　端粒

通常，DNA 的结构比 RNA 的结构要规则，在大多数情况下，DNA 都具有典型的 Watson-Crick 双螺旋结构。但是也有特殊结构的 DNA 存在，端粒就是一种，这种结构存在于染色体的末端。在染色体进行复制时，这种结构的存在可以确保染色体末端的遗传信息不丢失。

从四膜虫来源的一种端粒序列如下：

5′-GGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG-3′
3′ CCCCAACCCCAACCCCAACCCC-5′

实验证明，含有如上序列的寡聚核苷酸或含有连续 G 的其他寡聚核苷酸，会形成特殊的结构，在凝胶电泳上的迁移率表现异常。这种结果与实验中使用的盐离子有关，钾离子能够特异地稳定其中的一种结构，而钠离子则对其他种的结构更有效。钾稳定的结构是一种二聚体，其 3′突出端发生自身折回，这一特殊的几何结构已通过化学保护实验得以证实。在这一结构中，有 8 个鸟嘌呤残基的 O6 氧原子形成一个空洞，正好适合钾离子的大小。图 1.7 是这种推测结构的示意图。

最近，通过 NMR 和 X 射线晶体学方法，进一步证实了这种模型。图 7.17 显示了已经确切证明的三种结构。在 50 mmol/L NaCl 溶液中制备的含序列 $d(G_4T_4G_4)$ 的二聚体，用 NMR 技术，证明这一结构含有一种鸟嘌呤组成的四聚物。进一步的研究也都支持图 7.17 显示的结构：

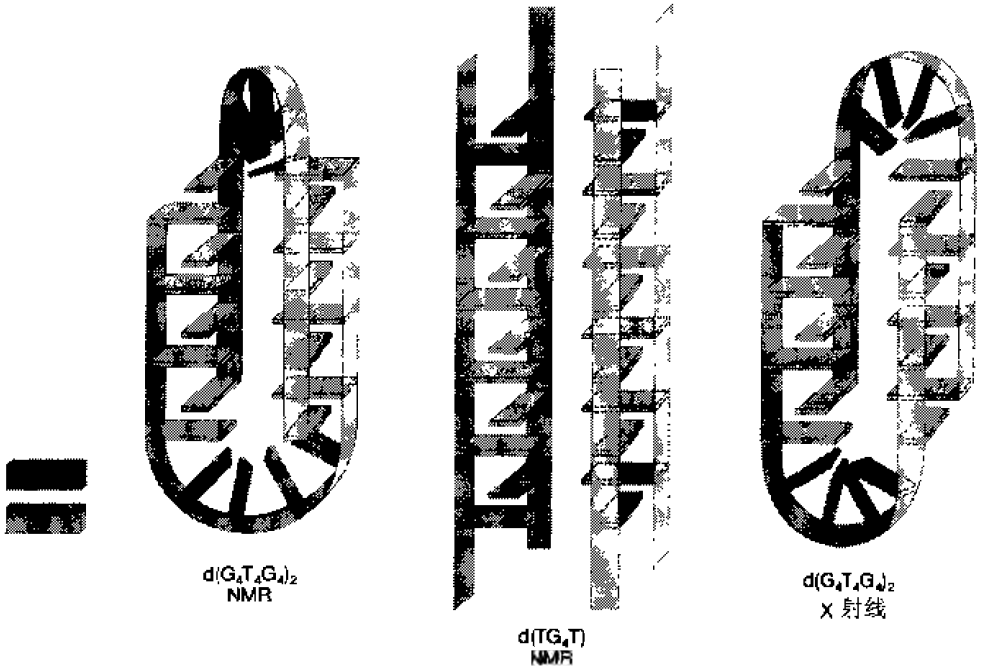


图 7.17　通过 NMR 和 X 射线晶体学方法确定的三种含有鸟嘌呤四聚体的寡核苷酸的结构

相邻的 DNA 双链，有一半处于平行，另一半处于反平行。在 100 mmol/L NaCl 中制备的含有序列 d(TG$_4$T)四聚体的 NMR 分析表明存在另一种不同的结构，所有的 DNA 双链都处于平行状态。已经在含有 60 mmol/L K^+ 的溶液中培育出了这一晶体，结构证明存在第三种结构，即是平行和反平行的混合物，但是具有完全不同的连接方式。在晶体结构分析中一个意外的发现是，在鸟嘌呤四聚体的中心存在部分无规则的钾离子。关于这些和其他结构的稳定性，还需大量的化学和生物方面的研究，一种可能是这种不同结构的转换是依赖于金属离子的。

7.3　蛋白质连接到金属结合的 DNA 上

DNA 上不同的特定序列所形成的不同结构用来控制细胞的很多功能，如转录的进行。我们已经清楚，含有锌离子的锌指结构域是如何与 DNA 结合并激活基因的。最近，实验表明，顺铂抗癌药物对 DNA 的修饰所引起的结构变化导致了细胞内的特异性蛋白质对这一段 DNA 的结合。这一发现进一步证实了金属离子能够诱发生物大分子折叠成合适的构象，进而改变它们的生理状态。随着我们对这方面的知识的增多，完全可以设计一些用于化疗的含金属的配合物。

7.3.a　顺铂抗癌药物对 DNA 的解旋和弯曲作用

当液相中的顺铂(见第 5 章)与 DNA 反应时，会有很多加合物形成，其中最主要是产生如下的交联：*cis*-[Pt(NH$_3$)$_2${d(GpG)}]和 *cis*-[Pt(NH$_3$)$_2${d(ApG)}]，它们含有大约相当于 90% 的处于结合状态的铂。癌症患者体内能够形成和保持这种产物的能力被认为与顺铂药物的疗效有关。通过 NMR 光谱分析和单晶 X 射线衍射技术已经确定了铂与 DNA 碱基的结合位置。在这些实验中，首先合成短的寡聚核苷酸，然后与 *cis*-DDP 反应，产物通过 HPLC 进行分离和纯化。对主要产物 *cis*-[Pt(NH$_3$)$_2${d(pGpG)}]作的 NMR 谱分析表明，铂与两个鸟嘌呤的 N7

结合，同时5′脱氧核糖核苷酸具有C3′-endo构象。X线晶体学方法进一步证实了这一结论并且提供了更为详尽的结构；它显示在d(pGpG)中，胺配体与5′端的磷酯基团有形成氢键的倾向。图7.18显示了这一结构。

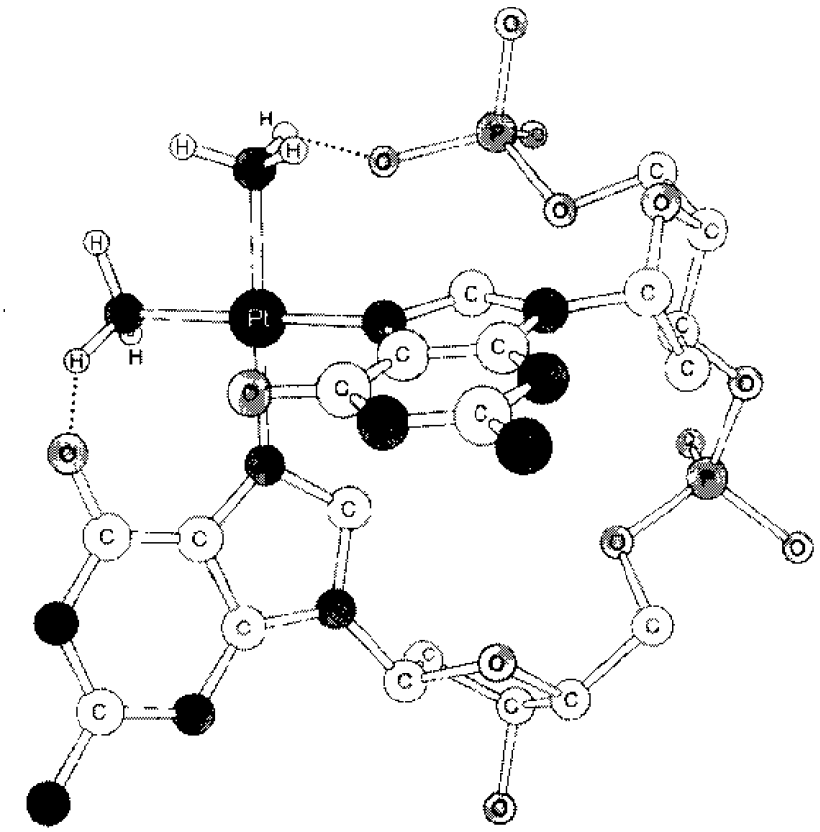


图7.18　X射线晶体学方法揭示的d(pGpG)的顺铂加合物

这些性质在长的寡聚核苷酸中也是成立的，在那里链内的d(GpG)或d(ApG)的铂化物是被包埋的。铂的结合导致了嘌呤环完全去堆积，并且二面角的范围在75～90°之间；而在没有铂结合的B-DNA中，这一角度≈±10°。这种碱基的去堆积，导致了DNA铂结合位置上的突出定向弯曲。

这种弯曲结构在凝胶电泳中已经得以确定，含有单个*cis*-[$Pt(NH_3)_2${d(GpG)}]或单个*cis*-[$Pt(NH_3)_2${d(ApG)}]的双链会发生寡聚(图7.19)。22个碱基长度的铂化产物会形成四聚、五聚和六聚的产物，相应的分子长度为88、110和132个碱基长度，这些分子可以通过端基与端基的相连形成多边形。这些线性寡聚物在凝胶电泳中的迁移率表现为迟滞效应，这暗示在d(GpG)和d(ApG)中铂结合位置的弯曲角度为32°或34°。这些结果表明，由于在鸟嘌呤N7位的铂化，DNA沿着大沟的方向发生折叠。图7.20显示了*cis*-DDP-铂化的DNA的一个折叠的结构。这种折叠产生了一种不同于正常的B-DNA的形状。

通过重复这些实验和改变铂在寡聚物上的结合位置，有可能观察到含有d(GpG)和d(ApG)交联的DNA所发生的局部扭曲或去缠绕及弯曲角度。正如在图7.19所显示的，在凝胶中的最大迁移率对应于铂与寡聚物结合的一种最佳状态，这时，铂原子之间有21.38个碱基对的距离。正常DNA的螺距为10.5个碱基对，因此二个螺旋对应于21.0个碱基对。这一事实显示在铂结合的双螺旋中，每一个结合的铂原子导致了螺距有0.38个碱基的延长，相应的

就有(0.38/10.5)×360°=13°的净去缠绕。当 *cis*-DDP 导致形成 d(GpTpG)链内交联，DNA 会产生 23°的去缠绕(图 7.19)。有趣的是，在用其他无化疗作用的铂化合物进行类似实验时，并没有像顺铂那样会引起 DNA 的折叠或双链的去缠绕。

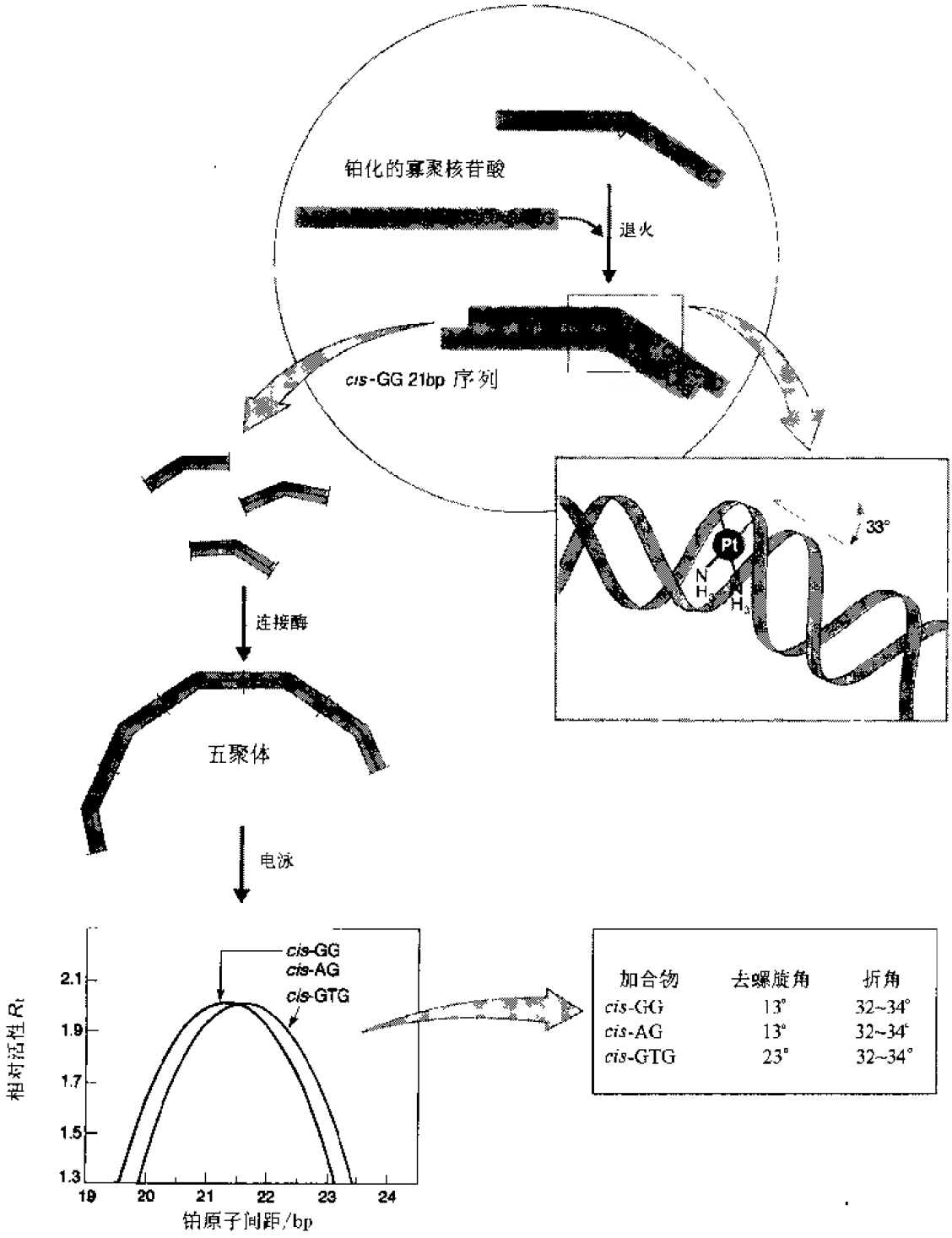


图 7.19 通过顺式二氯铂(Ⅱ)产物的形成来确定双链 DNA 的去折叠
一段合成的寡聚核苷酸先铂化然后与其互补链退火；形成的双链通过 DNA 连接酶形成寡聚物然后分离这些多聚物；测定这些产物的电泳迁移率；对不同的铂原子间距的寡聚物进行分析，然后计算出去折叠程度

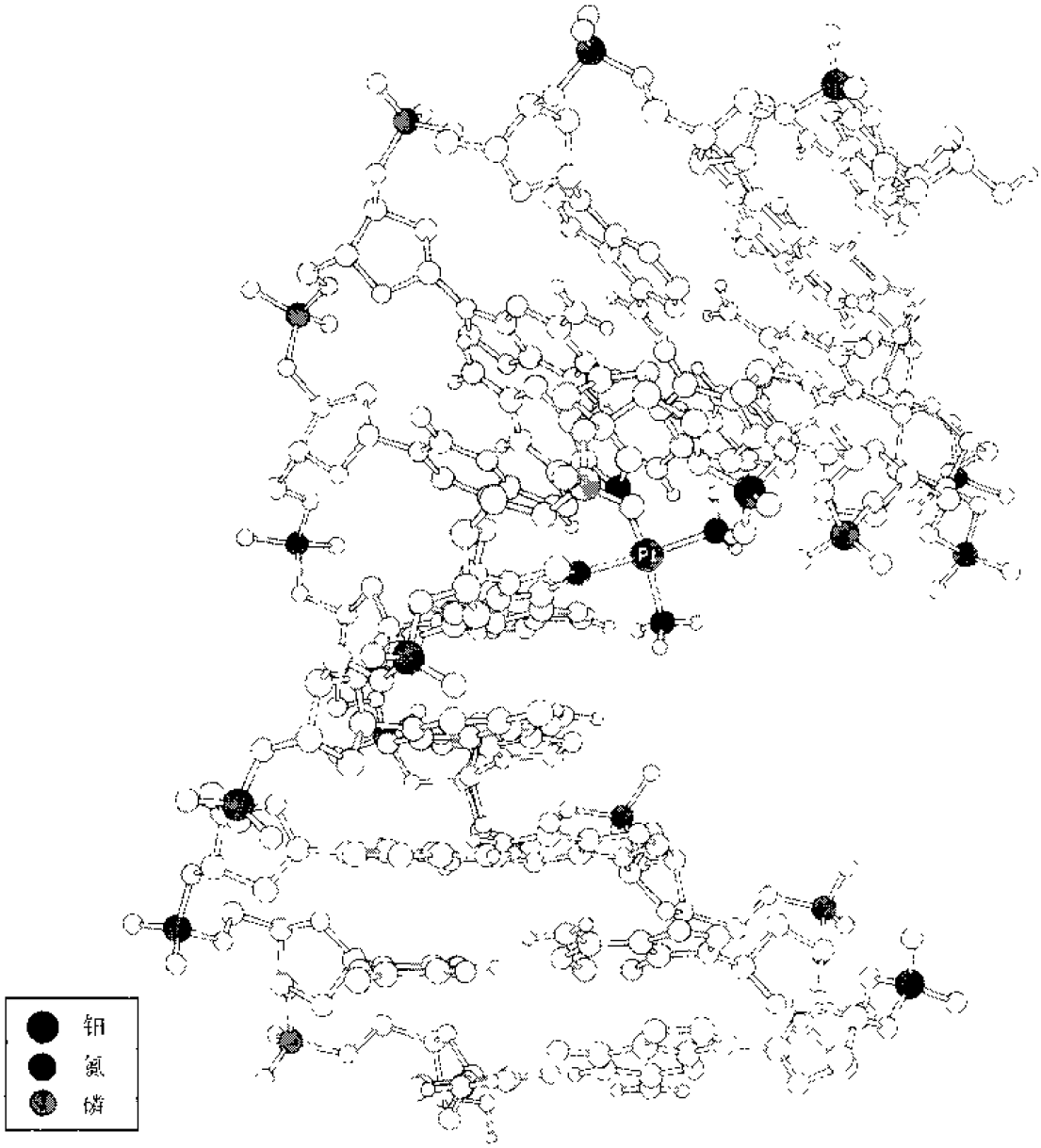


图 7.20　通过分子动力学计算出的含有顺式二氯铂(Ⅱ)链内交联的双链 DNA 的弯曲结构

7.3.b　高迁移率(HMG)蛋白对含顺铂链内 d(GpG)或 d(ApG)交联 DNA 的识别和结合作用

对顺铂作用机制的研究的一个主要目的是揭示该药物和其类似物是如何选择性的破坏肿瘤细胞，而在同样的用药浓度下，正常细胞却可以耐受。一个可能的假说是铂化的 DNA 在这二种细胞中的命运是不同的。例如，如果铂导致的 DNA 损伤在非肿瘤细胞中能更快的得到修复，而它在肿瘤细胞中就更具有毒性。在对这一假说作进一步的检验时，有几个实验室已经在人体细胞的细胞核和细胞质中鉴定出了几个蛋白质，它们可以和含有铂化产物的 DNA 优先结合。图 7.21 显示了在凝胶迁移率实验中证实这些因子的存在。应用限制性内切酶将长的双链 DNA 切割为短链，对其进行铂化、标记并在细胞抽提物存在和不存在的条件下进行非变性凝胶电泳。在细胞抽提物存在的情况下，相应标记 DNA 迁移率的降低表明有蛋白因子的结

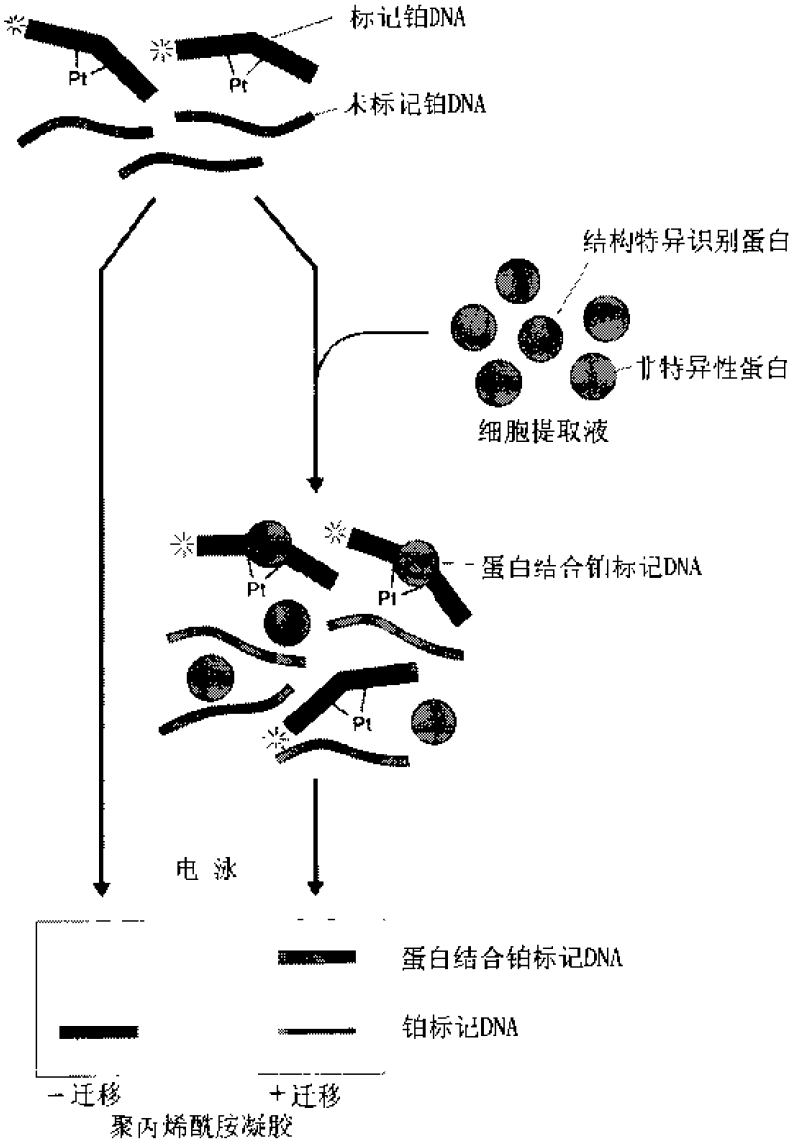


图 7.21　通过凝胶迁移实验检测在细胞提取物中存在的结构特异的识别蛋白

带负电的 DNA 分子在聚丙烯酰胺凝胶中从顶端(阴极)移动到底端(阳极)，蛋白质的结合减低了迁移率

合，特别的，用蛋白酶进行消化后，可恢复 DNA 的迁移率。在这种情况下，蛋白因子是特异地与含有 *cis*-DDP 的 DNA 结合，而不是与 *trans*-DDP 或$[Pt(dien)Cl]^+$结合。用这种位点被特异修饰的 DNA 分子，研究者们证实被识别的结构是

$$cis\text{-}[Pt(NH_3)_2\{d(GpG)\}] \text{ 或 } cis\text{-}[Pt(NH_3)_2\{d(ApG)\}]$$

形成的链内交联，而不是 *cis*-$[Pt(NH_3)_2\{d(GpTpG)\}]$1,3 形成的链内交联。有两类蛋白已依据它们的分子量得以鉴定，并被命名为结构特异识别蛋白(SSRPs)，分子量分别约 28 kDa 和 80～100 kDa。

关于这些蛋白的性质，近来已通过遗传学的方法知道了不少，应用顺铂修饰的 DNA 作为探针，在人细胞的 cDNA 表达文库中进行搜索，目前已获得有些结合蛋白的全长基因。基因序

列表明，81 kDa 蛋白，SSRP，具有很多带电的结构域，并且具有一段含有 75 个氨基酸的序列，该序列与核蛋白 HMG1（图 7.22）有 47%的同源性。该段序列被命名为 HMG box。HMG 蛋白（之所以如此称呼是因为在核蛋白的凝胶电泳中，表现为较高的迁移率）结合在 DNA 的十字结构上，并且推测在转录中可能会起到某种作用，但是在细胞内的确切作用尚不明确。它的分子量为 24.5 kDa。部分工作表明 HMG1 能够特异结合到含有

$$cis\text{-}[Pt(NH_3)_2\{d(GpG)\}] \text{ 或 } cis\text{-}[Pt(NH_3)_2\{d(ApG)\}]$$

链内交联的 DNA 上，但不能与含有 *cis* $[Pt(NH_3)_2\{d(GpTpG)\}]$1,3 链内交联的 DNA 或有 *trans*-DDP 或$[Pt(dien)Cl]^+$产物的 DNA 结合。

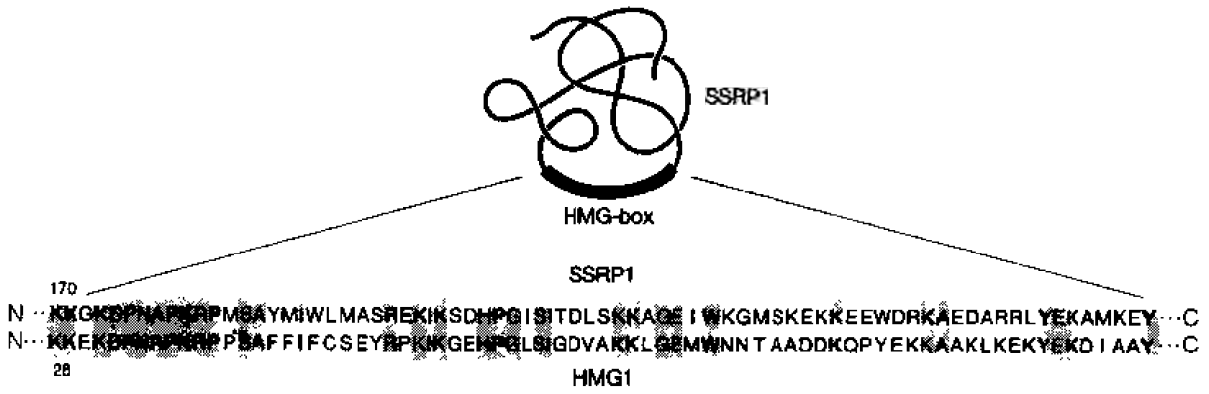


图 7.22　SSRP1 中的 HMG box 与 HMG1 的序列比较

这些结果都有力地表明，HMG1 和 SSRP1 可以识别在 DNA 上顺式二胺铂引起链内 d(GpG)和 d(ApG)交联的位点上所发生的去折叠和弯曲。顺铂的结合导致 DNA 形成一种可被 HMG1 和含有 HMG box 的蛋白特异结合的结构。这一反应有利于药物的抗癌活性的发挥，如图 7.23 所示。这些机制表明，如果在肿瘤细胞中，SSRP 的水平能够被控制的话，那这些细胞就会对顺铂变得特异敏感。

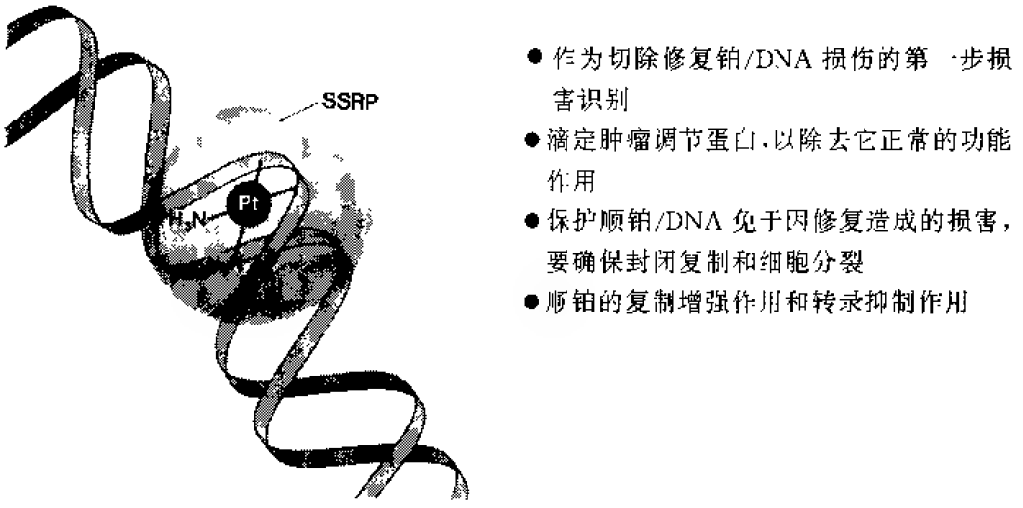
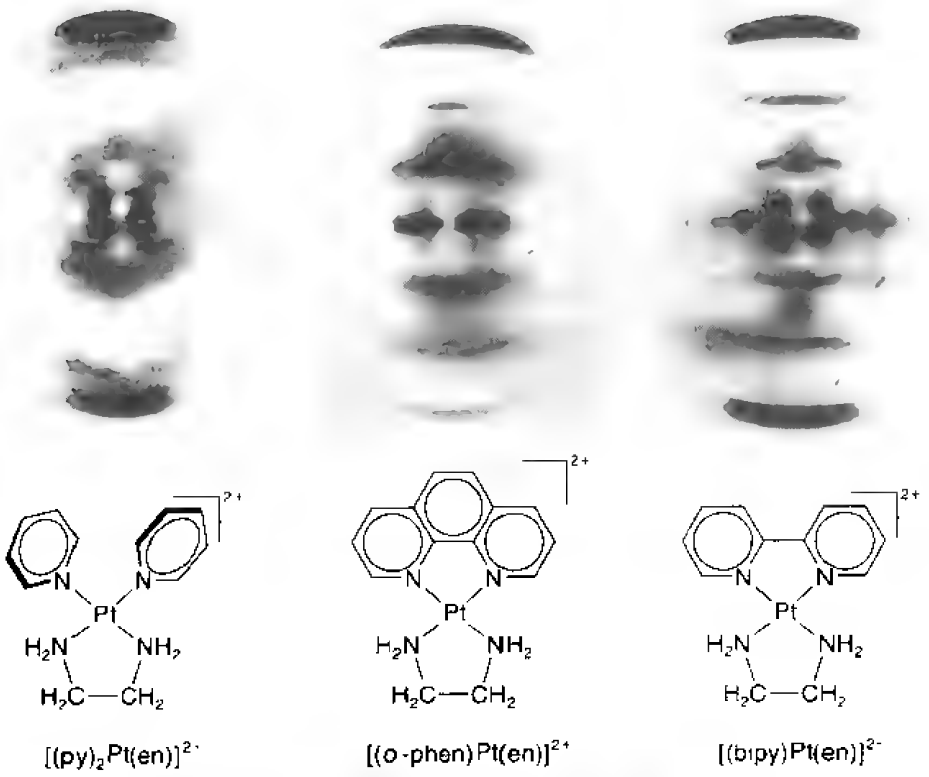


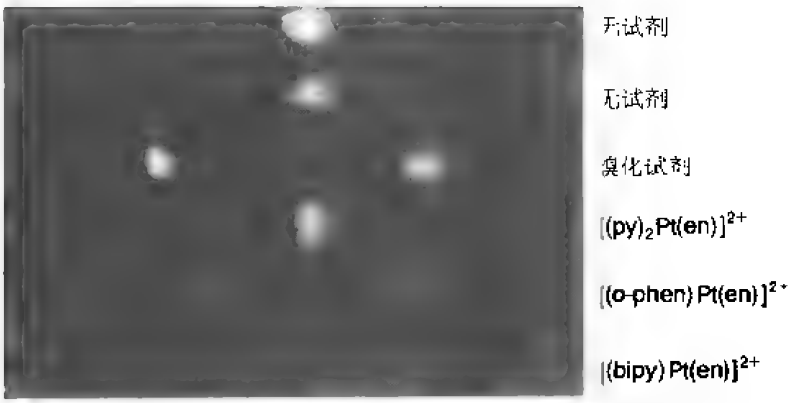
图 7.23　结构特异的识别蛋白 SSRP 与顺铂修饰的 DNA 的结合，可能会影响基因的功能
如果细胞内的 SSRP 降低或升高，均会造成细胞对药物的敏感

7.4 作为构象探针的金属组装结构

金属离子能够将小的分子组织成合适的构型，后者可以和特定的大分子发生特异性结合。近年来，通过这种引入中心金属离子来确定三维结构的研究发展很快。特别是研究与核酸相互作用的配合物中。



(a) 内催化剂的X射线纤维衍射和结构



(b) 电泳图形

图 7.24 X 射线衍射技术确定的几个化合物中 DNA 的嵌入模式

(a) 对 DNA 进行的 X 射线衍射分析图谱(左侧为没有嵌入的，中间和右边的为嵌入铂化合物；在水平方向 10.2 Å 和 5.1 Å 的强反射是金属嵌入物的象征)；(b)松弛环状和缺口 DNA 在无试剂和不同试剂存在情况下的凝胶电泳图谱(注意到只有嵌入物介导的超螺旋形成，才会导致迁移率的变化)

[摘自：S. J. Lippard et al., *Science* 194, 726～728(1976)]

7.4.a 金属嵌入物

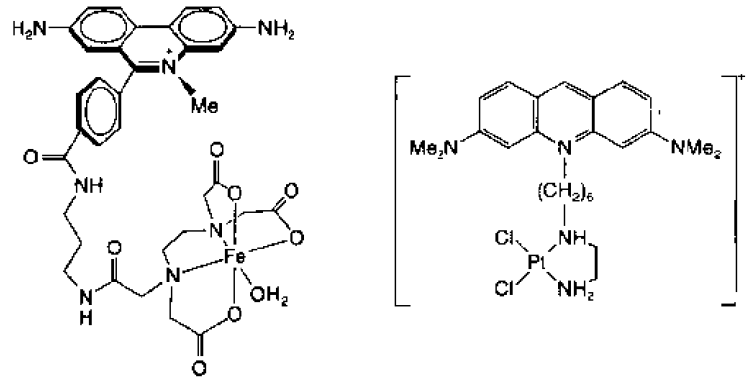
"嵌入"是像非啶镒类的平面芳香杂环阳离子与双链 DNA 结合的方式，大量的含氮杂环配体具有平面结构的阳性金属离子配合物也能够嵌入 DNA；如在 4.3.a 讨论的邻位排挤结合模型。在配合物$[Pt(terpy)(SCH_2CH_2OH)]^+$中，terpyridine 配体的三个环是共平面的，这种构象有利于嵌入到 DNA 中(图 4.3)。相类似的一系列化合物

$$[Pt(bpy)(en)]^{2+},[Pt(o\text{-}phen)(en)]^{2+}和[Pt(py)_2(en)]^{2+}$$

也具有这样的性质。图 7.24 显示了通过 X 射线衍射技术确定的含有前两个化合物的 DNA 的嵌入模式。但对于双(吡啶)配合物而言，两个嘧啶环不能处于共平面的位置，嵌入完全是离子性的而没有辅助因子的参与。其他能通过嵌入而与 DNA 结合的平面金属配合物是金属卟啉。另一种不同的金属嵌入分子，如

$$MPE\text{-}Fe(\text{Ⅱ})和[Pt(AO\text{-}en)Cl_2]\quad(AO=吖啶橙)$$

在这类化合物中，金属离子本身并不嵌入到碱基之间(图 7.25)。这里，金属部分可以产生羟自由基(MPE)或与 DNA 共价结合($[Pt(AO\text{-}en)Cl_2]$)。尽管金属嵌入物在核酸结构的研究中有很重要的用处，它们在自然体系中还并没有发现具此功能。



(a) MPE-Fe(II)　　(b) $[Pt(AO(CH_2)_6en)Cl_2]^+$

图 7.25 二个金属嵌入物的结构示意图

(a)MPE Fe(Ⅱ)和(b)$[Pt(AO(CH_2)_6en)Cl_2]^+$，它们的金属离子并不嵌入到 DNA 的碱基之间

7.4.b 构象识别

虽然双链 DNA 形成的结构与对 DNA 进行的 X 射线衍射得到的数据很相似，但通过高分辨率的单晶方法对寡聚核苷酸的研究揭示出 DNA 的结构中有很多变化。除了 A 型、B 型和 Z 型 DNA 外，沿着一个给定的 DNA 分子螺旋，会有一些序列特异的亚结构存在。通过 X 射线晶体学方法和 NMR 光谱学方法已经在很多 DNA 分子中观察到这种现象。因为这些方法难于在较大一些的 DNA 分子中应用，不仅费时，而且样品制备相对较为困难。在溶液体系中应用间接方法对 DNA 和 RNA 结构进行研究可克服这些困难。

早期的一个有趣的发现，是观察到三(菲咯啉)[tris(phenanthroline)]配合物的两个对应体与不同金属离子形成的配合物对 DNA 有不同的结合力。利用这种对应体选择的亲和性有助于合成一些 DNA 结合金属的螯合物，这些螯合物在氧原子或光化学反应引起 DNA 断裂中也是有用的。

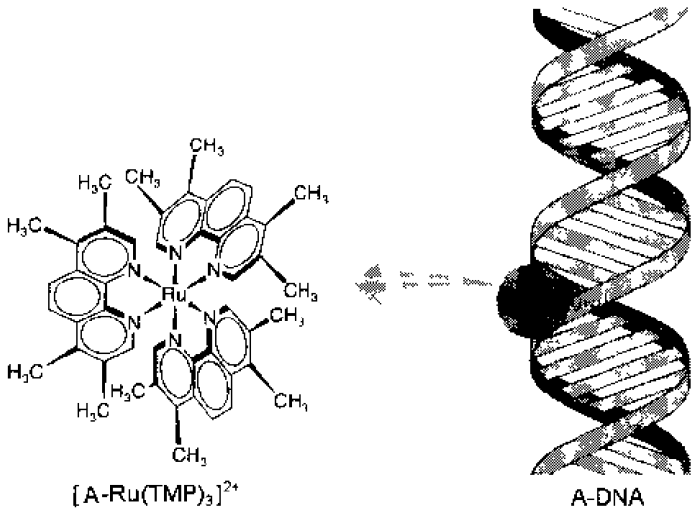


图 7.26　一种优先与 A 型双链 DNA 结合的金属配合物

图 7.26 描述了 tris (3,4,7,8-四甲基菲咯啉)Ru(Ⅱ)、$[Ru(TMP)_3]^{2+}$的作用方式。尽管甲基不参与嵌入结合，研究表明构型对应体在平衡点是优先结合的，而且与之结合的 DNA 采用 A 型的比 B 型的多，如 DNA-RNA 杂合体。这里以及其他的 Ru(Ⅱ)化合物能够在光和氧化学构成中断裂 DNA，后者涉及到单个氧原子的扩散。在这些化学性质的基础上，$[Ru(TMP)_3]^{2+}$被用来研究能够形成 A 型结构的大片段 DNA 分子。最近，一些新型的 Ru 和 Rh tris(chelate)螯合物已被用来研究溶液状态下的 RNA 的四级结构。通过研究这些化合物切割 DNA 的相应区域抵抗降解的实验，如 tRNA，我们可以获得有关金属结合位点的优先性的知识，进而可以研究其他 RNA 分子的四级结构，如可以通过 5S RNA 的被切割模式来研究它的结构。

习　题

1. 很多能被外加的镁离子稳定的 RNA 分子也可以被外加的$[Co(NH_3)_6]^{3+}$所稳定。通过这一现象，你认为$[Co(NH_3)_6]^{3+}$是否也能取代 Zn^{2+}来稳定蛋白质的结构呢？试解释。
2. 结合的金属离子稳定蛋白质的一个主要机制是通过引入交联来降低蛋白质构象变化的自由度。对于像 Cys-X_i-Cys-X_j-Cys-X_k-Cys 这样的金属结合序列，这种降低的构象的熵变为

$$R(-10.4-1.5\ln[(i+1)(j+1)(k+1)]),$$

这里 $R=1.987$ cal/(mol·K)。试计算一个胆固醇受体($i=2$, $j=13$, $k=2$)的构象降低的熵变，并解释，是什么因素使这种交联对蛋白质折叠的平衡常数产生影响(在室温下)？

3. 有一些蛋白质可以识别顺铂-DNA 产物，它们是通过与其上的十字结构结合而其作用的，后者具有回文结构。这一现象是否提供了一种顺铂作用的潜在模式呢？
4. 人生长激素能和二类不同的受体结合，其中一种还可以和催乳激素结合。研究表明可以同时结合人生长激素和催乳激素的受体在 EDTA 存在下与激素的反应较弱，但是当加入 50 μmol/L 的锌离子后这种相互作用会提高 8000 倍。定点突变实验证明，将生长激素的 His 18、His 21 或 Glu 174 突变为 Ala 后，激素与受体的结合作用会降低 2 个数量级；将催乳激素的 His188 突变被 Ala，会引起更大的变化[见 *Science* 250,1709(1990)]。试对这一结果提出一个合理的解释模型。

参 考 文 献

蛋白质结构的稳定化

Y. S. Babu, C. E. Bugg, and W. J. Cook. 1988. "Structure of Calmodulin Refined at 2.2 Å Resolution." *J. Mol. Biol.* 204, 191~204.

J. M. Berg. 1990. "Zinc Fingers and Other Metal-Binding Domains." *J. Biol. Chem.* 265, 6513~6516.

M. J. Cormier. 1983. "Calmodulin: The Regulation of Cellular Function," in T. G. Spiro, ed., *Calcium in Biology*. Wiley-Interscience, New York, 53~106.

R. M. Evans and S. M. Hollenberg. 1988. "Zinc Fingers: Gilt by Association." *Cell* 52, 1~3.

M. Ikura, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, G. Zhu, C. B. Klee, and A. Bax. 1992. "Solution Structure of a Calmodulin-Target Peptide Complex by Multidimensional NMR." *Science* 256, 632~638.

A. Klug and D. Rhodes. 1987. "'Zinc Fingers': A Novel Protein Motif for Nucleic Acid Recognition." *TIBS* 12, 464~469.

B. F. Luisi, W. X. Xu, Z. Otwinowski, L. P. Freedman, K. R. Yamamoto, and P. B. Sigler. 1991. "Crystallographic Analysis of the Interaction of the Glucocorticoid Receptor with DNA." *Nature* 352, 497~505.

R. Marmorstein, M. Carey, M. Ptashne, and S. C. Harrison. 1992. "DNA Recognition by GAL4: Structure of a Protein-DNA Complex." *Nature* 356, 408~414.

W. E. Meador, A. R. Means, and F. A. Quiocho. 1992. "Target Enzyme Recognition by Calmodulin: 2.4 Å Structure of a Calmodulin-Peptide Complex." *Science* 257, 1251~1255.

K. T. O'Neil and W. F. DeGrado. 1990. "How Calmodulin Binds Its Targets: Sequence-Independent Recognition of Amphiphilic α-Helices." *TIBS* 15, 59~64.

N. P. Pavletich and C. O. Pabo. 1991. "Zinc Finger–DNA Recognition: Crystal Structure of a Zif268-DNA Complex at 2.1 Å." *Science* 252, 809~817.

M. F. Summers, L. E. Henderson, M. R. Chance, J. W. Bess, Jr., T. L. South, P. R. Blake, I. Sagi, G. Peret Alvarado, R. C. Sowder III, D. R. Hare, and L. O. Arthur. 1992. "Nucleocapsid Zinc Finger Detector in Retroviruses: EXAFS Studies of Intact Viruses and the Solution-Structure of the Nucleocapsid Protein from HIV-1." *Pro. Sci.* 1, 563~574.

天冬氨酸转氨甲酰酶

E. R. Kantrowitz and W. N. Lipscomb. 1988. "*Escherichia coli* Aspartate Transcarbamylase: The Relation Between Structure and Function." *Science* 241, 669~674.

D. W. Markby, B.-B. Zhou, and H. K. Schachman 1991. "A 70-Amino Acid Zinc Binding Polypeptide from the Regulatory Chain of Aspartate Transcarbamoylase Forms a Stable Complex with the Catalytic Subunit Leading to Markedly Altered Enzyme Activity." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10568~10572.

M. E. Nelbach, V. P. Pigiet, Jr., J. C. Gerhart, and H. K. Schachman. 1972. "A Role for Zinc in the Quaternary Structure of Aspartate Transcarbamoylase from *Escherichia coli*." *Biochemistry* 11, 315~327.

H. K. Schachman. 1988. "Can a Simple Model Account for the Allosteric Transition of Aspartate Transcarbamoylase?" *J. Biol. Chem.* 263, 18583~18586.

核酸结构的金属离子稳定化

F. Aboul-ela, A. I. H. Murchie, and D. M. J. Lilley. 1992. "NMR Study of Parallel-Stranded Tetraplex Formation by the Hexadeoxynucleotide d(TG_4T)." *Nature* 360, 280 - 282.

E. H. Blackburn. 1990 "Telomeres: Structure and Synthesis." *J. Biol. Chem.* 265, 5919~5921.

D. W. Celander and T. R. Cech. 1991. "Visualizing the Higher Order Folding of a Catalytic RNA Molecule." *Science* 251, 401~407.

D. E. Draper. 1992. "The RNA-Folding Problem." *Acc. Chem. Res.* 25, 201~207.

A. Jack, J. E. Ladner, D. Rhodes, R. S. Brown, and A. Klug. 1977. "A Crystallographic Study of Metal-Binding to Yeast Phenylalanine Transfer RNA." *J. Mol. Biol.* 111, 315~328.

C. Kang, X. Zhang, R. Ratliff, R. Moyzis, and A. Rich. 1992. "Crystal Structure of Four-Stranded *Oxytricha* Telomeric DNA." *Nature* 356, 126~131.

D. Sen and W. Gilbert. 1990. "A Sodium-Potassium Switch in the Formation of Four-Stranded G4-DNA." *Nature* 344, 410~414.

F. W. Smith and J. Feigon. 1992. "Quadruplex Structure of *Oxytricha* Telomeric DNA Oligonucleotides." *Nature* 356, 164~168.

W. Sundquist and A. Klug. 1989 "Telomeric DNA Dimerizes by Formation of Guanine Tetrads Between Hairpin Loops." *Nature* 342, 825~829.

J. R. Williamson, M. K. Raghuraman, and T. R. Cech. 1989. "Monovalent Cation-Induced Structure of Telomeric DNA: The G-Quartet Model." *Cell* 59, 871~880.

用铂抗癌药物改性的伸直的和弯曲的 DNA

S. F. Bellon and S. J. Lippard. 1990. "Bending Studies of DNA Site-Specifically Modified by Cisplatin, *trans*-Diamminedichloroplatinum (II), and *cis*-$[Pt(NH_3)_2(N3\text{-cytosine})Cl]^+$." *Biophys. Chem.* 35, 179~188.

S. F. Bellon, J. H. Coleman, and S. J. Lippard. 1991. "DNA Unwinding Produced by Site-Specific Intrastrand Cross-Links of the Antitumor Drug *cis*-Diamminedichloroplatinum (II)." *Biochemistry* 30, 8026~8035.

S. L. Bruhn, P. M. Pil, J. M. Essigmann, D. E. Housman, and S. J. Lippard. 1992. "Isolation and Characterization of Human cDNA Clones Encoding a High Mobility Group Box Protein that Recognizes Structural Distortions to DNA Caused by Binding of the Anticancer Agent Cisplatin." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2307~2311.

P. M. Pil and S. J. Lippard. 1992. "Specific Binding of Chromosomal Protein HMG1 to DNA Damaged by the Anticancer Drug Cisplatin." *Science* 256, 234~237.

金属组装的结构作为构象探针

J. K. Barton. 1986. "Metals and DNA: Molecular Left-Handed Complements." *Science* 233, 727~734.

A. M. Pyle and J. K. Barton. 1990. "Probing Nucleic Acids with Transition Metal Complexes," in S. J. Lippard, ed., *Progress in Inorganic Chemistry*, Volume 38. Wiley-Interscience, New York, 413–475.

D. S. Sigman. 1986. "Nuclease Activity of 1,10 Phenanthroline–Copper Ion." *Acc. Chem. Res.* 19, 180~186.

T. D. Tullius, ed. 1989. *Metal-DNA Chemistry*, Number 402. ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC.

第 8 章　金属离子和配合物与生物分子活性中心的结合

8.1　金属离子对蛋白质位置的选择和插入
8.2　电中性的保持
8.3　金属离子和金属配合物与核酸的结合
8.4　生物高分子促进的金属-配体的相互作用

生物分子能够根据金属离子的电荷、半径、易变性、软硬度、在 Irving-Williams 序列中的位置、配体和其他配位优选、以及生物利用率选择金属离子。有些体系很明显是受热力学控制的；而在另外一些体系中动力学因素则显得更重要。当与生物高分子如蛋白质和核酸结合时，形状选择性被用来区分相关的但立体化学上不同的金属配合物。特殊的酶可以通过改变受体的形状使其易于配位，从而克服金属离子插入到配位位置时的动力学势垒。由于大多数情况下金属结合位置都被蛋白质所覆盖，所以整体常常为电中性。配体质子化或去质子化平衡在维持电荷平衡方面起着重要作用。

8.1　金属离子对蛋白质位置的选择和插入

在第 5 章和第 6 章我们已经看到，细胞是如何选择和积累特定的金属离子，以便结合到金属蛋白或者核酸结构中去的。在接下来的几章中，我们将讨论特定金属离子是如何被生物主体微调而履行不同功能的。积累与功能两个主题之间的关系，取决于“正确的”金属离子插入到它们的生物结合位置。不正确的金属离子的插入会导致不利的后果。例如，锌结合到电子转输蛋白（见 9.1.b 节）中铜位置上将产生一个不能进行氧化还原化学过程的分子。这是因为在正常条件下锌只有一个可以利用的氧化态。类似地，如果一个氧化还原性的金属离子错误地结合到锌指蛋白质中，原则上将导致在基因组中关键 DNA 识别位置附近发生氧化断裂反应。因此，生物体系中金属蛋白的正确作用要求适当的金属离子的专一结合、排除不适当的金属离子。在本章中，我们将考察自然界为实现这个专一性而采取的策略。

8.1.a　热力学控制

在有些体系中，热力学因素决定着哪个或者哪些金属离子结合到金属结合位置上去。我们将通过讨论三个例子来描述实现适当的热力学优选的化学特性。第一个例子涉及到在 7.1.b 节中讨论过的锌指蛋白。演示金属离子在 TFⅢA 转录因子中作用的早期实验显示，加入的 Zn^{2+} 能够重新活化经 EDTA 处理过的蛋白质。在类似的浓度下其他金属离子，如 Co^{2+}、Ni^{2+}、Fe^{2+} 和 Mn^{2+}，不能恢复蛋白质的活性。问题在于：金属离子在蛋白质中对半胱氨酸结合位置和对组氨酸结合位置的亲和力的差别能否解释这些现象。利用直接光谱测定具有各种各样金属离子的一个单锌指肽配合物的解离常数，对这个问题进行了研究。对于 Zn^{2+}、Co^{2+}、

Ni^{2+}、Fe^{2+}和 Mn^{2+}，测得其解离常数分别为 2 pmol/L、50 nmol/L、2 μmol/L、3 μmol/L 和大于10 μmol/L。这说明锌和蛋白质的结合强度比其他金属离子要强 1000～100 000 倍。因此，这个事实说明了锌离子在活化 TF ⅢA 时的独特作用。

金属离子结合到四面体锌指位置(图 8.1)时配位场稳定化能(LFSE)的变化可以合理地解释锌离子的特效性。在一个非球形对称的位置上(2.3 节)d 轨道发生分裂，配位场稳定化能(LFSE)就是和 d 轨道发生分裂时产生的 d 轨道非简并化能相关的能量。对于 Zn^{2+}这样的一个 d^{10}离子，在任何几何形状下配位场稳定化能都为零。然而，在具有不完全填满 d 轨道的离子的情况下，配位场稳定化能不是零，其大小取决于配位几何形状和配体的性质。作为一个例子，我们来考虑一下一个 d^7 离子，在如$[Co(OH_2)_6]^{2+}$离子的八面体场中，配位场稳定化能为 $(-4/5)\Delta_o$，这里符号 Δ_o 表示 t_{2g}(d_{xy}，d_{xz}，和 d_{yz}) 轨道和 e_g(d_{z^2}和 $d_{x^2-y^2}$)轨道之间的能量差。对于水合离子，$\Delta_o=9300\ cm^{-1}$，所以配位场稳定化能等于 $-7440\ cm^{-1}$，或 -21.3 kcal/mol。对于四面体场中的 Co^{2+}，配位场稳定化能为$(-6/5)\Delta_t$，这里符号 Δ_t 表示四面体场中 d 轨道的分裂能，大约是八面体场中 d 轨道分裂能的一半。在一个含有 2 个半胱氨酸硫脂和 2 个组氨酸咪唑配体的锌指场中，$\Delta_t=4900\ cm^{-1}$，所以配位场稳定化能等于 $-5800\ cm^{-1}$，或 -16.8 kcal/mol。这些数据表明，从水溶液的八面体场转变到锌指结构域的四面体场，Co^{2+}离子配位场稳定化能损失了

$$(21.3 - 16.8)\text{kcal/mol} = 4.5\ \text{kcal/mol}$$

的能量。相反，在 Zn^{2+}离子的情况下，不存在配位场稳定化能的损失。因为在任何几何形状下配位场稳定化能都为零。这种配位场稳定化能变化的不同半定量地解释了 Zn^{2+}和 Co^{2+}锌指肽配合物的解离常数观测值的不同。

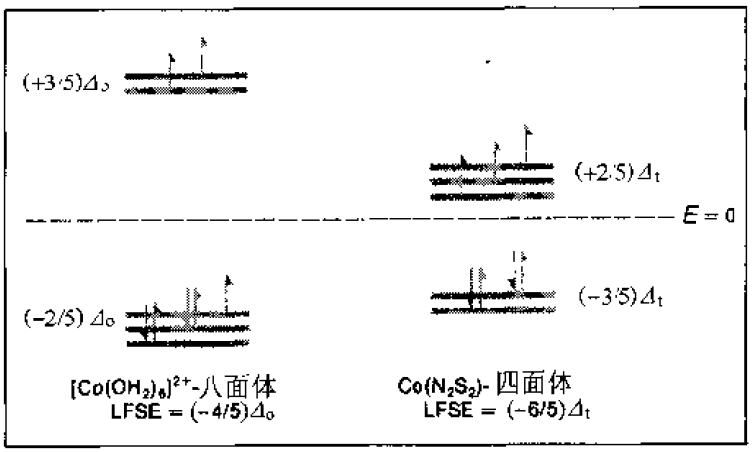


图 8.1　Co(Ⅱ)(d^7)在水溶液八面体场中和锌指蛋白 Cys_2His_2 四面体场中的配位场稳定化能(LFSE)

金属结合优选不只是受到配位场稳定化能(LFSE)的影响。其他因素，包括金属离子的软硬酸碱性及其在 Irving-Williams 序列中的位置，对金属结合优选同样起到重要的决定性作用。作为对这一点的描述，我们来考察一下 Zn^{2+}和 Cd^{2+}结合到如前面讨论过的 Cys_2His_2 位置和结合到如在甾类受体中发现的 Cys_4 位置时的情况。由于这两个离子都具有 d^{10}电子构型，所以配位场稳定化能(LFSE)的影响不重要。对于 Cys_2His_2 位置，Zn^{2+}的结合强度要比 Cd^{2+}的结合强度高出 2 个数量级。但是，对于 Cys_4 位置，Cd^{2+}的结合强度要比 Zn^{2+}的结合强度高出 2～

3 个数量级。这种显著差别能够通过金属离子的软硬酸碱效应得到解释。周期表中镉处在锌的下面，所以较软。因此，镉倾向与较软的硫配体结合而不喜欢与较硬的氮配体结合(2.1 节)。

在金属定点选择性中热力学作用的第二个例子是钙结合到 EF-手蛋白。因为这些蛋白受到细胞内钙离子浓度变化的影响，它们必须进行较快的金属交换反应。由于这个原因，金属结合必受到热力学控制而不是受到动力学控制。另外，如在 7.1.c 节中讨论过的一样，这些蛋白必须合理地选择 Ca^{2+}，而不选择其他离子，尤其是 Mg^{2+}和单价离子，如 Na^{+}和 K^{+}。大部分金属结合特异性，能通过软硬酸碱效应和配位数效应得到解释。钙是一个较硬的金属，有与氧配体结合的强烈倾向。EF-手位置完全是由含氧配体构成的，如羧基和酰胺侧链，肽羰基基团，以及没有被取代的水分子。这些位置的配位数一般为 7。如前面讨论过的一样，这个高配位数更倾向于较大的 Ca^{2+}离子而不是 Mg^{2+}离子。

第三个例子涉及到铁-硫蛋白。铁-硫蛋白包含多个不同的活性中心，从单铁离子到 Fe_2S_2、Fe_3S_4和 Fe_4S_4 簇合物。这些单元几乎都是通过半胱氨酸硫脂侧链的硫脂基团与蛋白结合的。因为这些不同的中心具有不同的电子性质，正确的簇合物插入到每一个蛋白位置是很重要的。铁-硫蛋白生物合成的机理还不是很清楚。大量的研究表明，甚至在水溶液中这些簇合物也将自发地自我组装。因此，有可能在蛋白质折叠过程中单核铁前体和硫配体形成了这些簇合物。另一种可能性是发生了簇合物转移反应。据此，通过将其较简单的硫基配体交换成半胱氨酸脂基团，一个预组装的簇合物被从溶液中转移到蛋白质中的某个位置上。在 5.3.a. vi 节中讨论过鉴别铁-硫簇合物的核心挤出方法。这种反应构成了鉴别铁-硫簇合物的核心挤出方法的基础。核心挤出法依赖于式 5.9 所示的反应。在适当的条件下，过量的巯基能够从它的蛋白质环境中完整地移去一个簇合物。这些挤出的原子簇不仅仅可在与简单巯基硫配位相结合的自由形式下得到表征，还可以加入适当的脱辅基蛋白进行捕捉。例如，脱辅基肾上腺铁氧还蛋白——一个 Fe_2S_2 原子簇结合蛋白和脱辅基 *B.* 多粘杆菌(*B. polymyxa*)铁氧还蛋白——一个 Fe_4S_4 原子簇结合蛋白，已经通过稀释有机溶剂利用上述方式被再生和再折叠。总反应如式 8.1 所示：

$$\begin{aligned}&[Fe_2S_2(SR)_4]^{2-}\text{ 脱辅基肾上腺 Fd}\xrightarrow[\text{连二亚硫酸盐}]{\text{再折叠}}\text{肾上腺 Fd}_{\text{还原}}\\&[Fe_4S_4(SR)_4]^{2-}\text{ 脱辅基 }B.\text{ 多粘菌素 Fd}\xrightarrow[\text{连二亚硫酸盐}]{\text{再折叠}}B.\text{ 多粘菌素 Fd}_{\text{还原}}\end{aligned}\qquad(8.1)$$

强还原剂连二亚硫酸盐的参与产生了再生蛋白的还原态。这些再生蛋白的还原态能够通过 EPR 得到鉴定。在发展这些方法中所做的实验已经证实，脱辅基铁氧还蛋白对它们的关联原子簇有强的倾向。因为 Fe_2S_2相对于 Fe_4S_4 原子簇，4 个巯基硫配位的位置是不同的，所以这些蛋白质折叠结构的形状差异可能是这种识别的基础。

8.1.b 动力学控制

在被动金属结合中，一个金属离子的插入不被任何外部试剂所支持。这种被动金属结合可能是金属离子结合到许多体系中的原因。其他一些脱金属蛋白质或辅基不以保持生物活性的速率结合金属离子。对于这样的体系，金属的结合必须得到别的机制或因素的支持，并且受到动力学控制而非热力学控制。尽管还没有任何这样的体系得到全面细致的理解，我们仍将在这里讨论一个得到较好研究的例子。

假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)中的含铜氧化亚氮还原酶，是在去硝过程中或除去土壤中硝酸盐时起作用的一种酶。遗传实验揭示，某种突变种制造了这种酶的无铜脱辅基形态。其

中一种突变种缺少 NosA 基因的组分，作 N 为一种插入酶从外部介质中摄取铜并将它转移到脱辅基酶中。在细胞的外膜中发现了这种 NosA 基因的组分，并且已经得到纯化和部分表征。而氧化亚氮还原酶存在于 periplasm。NosA 有一个质量为 65 kDa 的亚单元，一个亚单元结合一个铜。NosA 对外源的铜浓度极其敏感，微摩尔(μmol)级范围的铜就可使其显著还原。因为该蛋白将铜转移到脱辅基酶的能力还没有得到证实，所以其他因素也可能是必要的。最近，又有 3 个基因得到鉴定，它们是 NosD、NosF 和 NosY。铜识别或处理时三者都需要。它们的基因产物为 NosF，一个 33.8 kDa 蛋白质，具有一个核苷酸(如 ATP 或 GTP)结合位置；NosY，29.4 kDa，可能是一个跨膜蛋白；NosD，一个 48.2kDa 的胞质(periplasmic)组分。虽然这些组分的特殊功能还不清楚，铜插入到 N_2O 还原酶时需要它们。Nos 蛋白家族仅仅代表了许多可能的由基因技术鉴别的插入酶体系的一种。

随着对这些体系越来越多的了解，通过对蛋白的解释和研究，我们可以获得更多的新信息。值得指出的是，金属插入突变种可能在机制上与多种不同的缺陷相关，包括金属摄取、蛋白质侧链的修饰、蛋白质折叠和反折叠以及辅因子或效应物分子的生物合成。传递并将金属离子插入到蛋白质活性位置的系统，可能和已经进化为传递小分子的其他细菌系统有相同之处。

亚铁螯合酶体系是动力学因素而非热力学因素决定金属离子结合到活性生物分子中心的另外一个例子，将在 8.4.a 节中讨论。

8.1.c 生物利用率

一个体系无论是受热力学控制还是受动力学控制，必须存在有足够的相关金属离子进行结合，也可能与任何其他适合于受体位置的金属进行竞争。有机体通过一些机制积累并调节金属离子浓度。我们在第 5 章和第 6 章讨论过这些机制的一部分。很明显，这种体系对金属生物分子生物合成是至关重要的。金属离子生物利用率的重要性的直接证据是通过观察不同蛋白质而获得的。这些不同蛋白质具有来自于不同生物体的极其类似的金属结合位置。产生于细菌如 *Clostridium* 和 *Desulfovibrio* 的红氧还蛋白(5.3.a.i 节)，和产生于 *E. coli* 的天冬氨酸氨基甲酰转移酶(7.1.a 节)是两个这样的蛋白。这种蛋白的每一个都含有一个由 4 个半胱氨酸硫脂基团组成的，整体结构很类似的金属结合位置。然而，只有红氧还蛋白的铁配合物和 ATC 酶的锌配合物被报道从天然物中分离出来。金属结合到 4 个半胱氨酸位置的热力学研究表明，Zn(Ⅱ)的结合比 Fe(Ⅱ)的结合牢固的多。因此，分离得到的红氧还蛋白仅仅含有铁的实事强烈地表明，在利用这种蛋白的细菌物种中，相对于铁浓度而言，锌浓度是有限的。在 *E. coli* 中，红氧还蛋白的异常表现研究结果进一步支持了这种观点，发现产生的大多数蛋白质含锌而不含铁。还有一种解释不能排除，这就是，一个或者两个细菌体系含有辅助因子，而这些辅助因子介入了金属结合。

8.2 电中性的保持

许多金属结合位置被深深地埋在蛋白质中。因为金属离子带正电荷，这种部位能量很高。因此，如果这些金属离子的大部分正电荷不能被带负电荷的配体所中和，与蛋白质结合将是不利的。对完好的金属结合点进行的考察揭示，大部分情况下，总电荷非常接近于零。当金属离子处在或接近于蛋白质表面时，会发生例外。

8.2.a 单核点

金属生物分子中的许多位置含有单一金属离子。这些金属离子具有从+1到+6的表观氧化态，能以几种不同的方式被中和。我们首先考虑仅仅由蛋白质侧链组成的位置。实例包括锌指蛋白位置(7.1.b节)、蓝铜蛋白位置(9.1.b节)以及红氧还蛋白中的铁位置(5.3.a.i节)。在第一个例子中，金属离子是Zn(Ⅱ)，配体是从两个半胱氨酸和两个组氨酸残基衍生来的。半胱氨酸与金属结合时脱去质子，而组氨酸为中性。因此在配体上的总电荷为−2，配合物的电荷为0。对于蓝铜蛋白位置，结合的金属离子是铜，其氧化态从+1到+2。配体是一个半胱氨酸、两个组氨酸、一个甲硫氨酸，也许还有一个肽羰基，因此配体所贡献的总电荷为−1。所以，配合物的电荷在还原形Cu(Ⅰ)的情况下是0，在氧化形Cu(Ⅱ)的情况下是+1。对于红氧还蛋白，金属是Fe(Ⅱ，Ⅲ)，配体是4个半胱氨酸酯。配合物的总电荷对于还原形是−2，对于氧化形是−1。这里残基的电荷在任何一种氧化态下均保持不变。但是，由于这个位置接近蛋白质表面，一些电荷被肽的酰胺与半胱氨酸酯的硫原子之间的氢键所中和。

其他单核点具有一些敞开配位位置，可被底物或者溶剂分子所占据。不可避免地，这些位置接近蛋白质表面，但是在一定程度上保持了达到电中性的倾向。然而，在碳酸酐酶(10.1节)的活性位置中，蛋白质贡献的配体没有中和锌的+2电荷，因为使用的氨基酸侧链是三个中性的组氨酸基团。但是，余下的一个位置是被一个水分子所占据。该水分子具有相当低pK_a值，以至于被很容易地脱去质子形成OH^-，中和部分电荷。总而言之，配位水分子的脱质子平衡对于一个金属位置上的电荷调节提供了另外一个机制。

许多单核点含有如卟啉这样的辅基贡献配体。这里电中性又一次被保持。自由卟啉是中性的，电荷分散在外围的丙酸基团上。一旦与金属结合，两个质子被释放(式8.2，8.4.a节)。所以，对于一个+2电荷的金属，金属卟啉配合物为中性；对于一个+3电荷的金属，金属卟啉配合物总电荷为+1。这个剩余的电荷能被半胱氨酸酯或酪氨酸酯轴向配体所中和。

最后的一个例子关于含有钼辅因子的酶(5.4.d节)。在被氧化的形式下，钼在这些酶中的形式氧化态常常是+6。它被钼喋呤(molybdopterin)双硫酯基团的2个负电荷以及2个末端桥氧基或者1个桥氧基和1个硫氧基所中和。这里辅基和脱去质子的水协同作用，生成一个电中性物种。

8.2.b 多核点

由于多金属中心具有多个正电荷单位，在保持电中性时可能存在更大的问题。但是，能够桥联两个或者多个金属离子的配体，使得脱质子和形成负电荷残基更容易，提供了电荷中性化的另一种途径。另外，一个多核中心上较高的总电荷是比较有利的，因为它可被离域在几个原子上。我们来考察三个例子。

第一个例子是关于Cu-Zn超氧化物歧化酶(SOD)。一个被3个组氨酸和1个天冬氨酸配位的Zn(Ⅱ)，和一个被4个组氨酸配位的Cu(Ⅰ，Ⅱ)离子，构成了这个酶的活性点。在一般情况下，配体的这种排布将可能使双金属中心上具有+2或者+3的总电荷，配体只提供一个负电荷。然而，在SOD中，组氨酸咪唑配体之一被脱去质子并被两个金属离子共享，如此又贡献了一个负电荷。结果，Cu(I)配合物上的总电荷为+1。值得指出的是，这个剩余的正电荷具有重要的作用。和附近氨基酸侧链所提供的其他正电荷一起，这个剩余的正电荷帮助产生一个静电势，从而将带有负电荷的底物O_2^-吸引到活性位置(11.4.a节)。

第二个例子涉及到铁-硫簇合物。一个四铁原子簇中的铁离子中心，根据它们的氧化态带有从+9～+11个电荷。该正电荷被一组每个提供2个负电荷的桥联硫化物基团和负离子性端基配体，如半胱氨酸硫脂配体所中和。端基硫化物基团在金属生物分子中非常少见，黄嘌呤氧化酶的活性位置是一个例子。双或三桥联硫化物基团是很常见的。对于一个四铁原子簇，4个三桥联硫化物基团提供8个负电荷。含有4个端基半胱氨酸硫脂配体的$Fe_4S_4(SR)_4$的总电荷为从−3到−1，或者每个金属离子少于−1。很像红氧还蛋白，这个负电荷被结合到硫化物的肽酰胺氢或者端基硫醇基团所中和。

第三个例子涉及到蚯蚓血红蛋白的二铁中心。在其脱氧型中，两个带有5个咪唑和2个羧基作为蛋白派生配位的Fe(Ⅱ)离子构成了其核心(图1.2)。一个溶剂派生的氢氧离子桥联两个铁离子，总电荷为+1。O_2的结合导致了显著的电子重排。铁被氧化成Fe(Ⅲ)，O_2被还原成过氧化物并被质子化，氢氧根脱去质子形成氧化物。如此以来，总的有5个负电荷(2个来自于羧基，1个来自于氢过氧化物，还有2个来自于氧化物)和来自于两个三价铁的6个正电荷，所以总电荷被维持。这个例子再次说明配位质子化和去质子化平衡能够起到保持大致电荷平衡的作用。

8.3 金属离子和金属配合物与核酸的结合

在8.1节中讨论的许多关于金属离子-蛋白质相互作用的原理也适用于金属核酸结合，这里不再进一步详细介绍。但是，如在1.2节讨论过的一样，对于以金属为基础的药物，核酸是生物目标分子。我们可能要问，这些非天然金属配合物在结合到它们的细胞受体时是否遵循相同的原理。作为这类药物的范例，我们将考虑顺铂与它的主要生物目标DNA之间的反应化学。这个例子使人注意到金属离子结合生物高分子时选择性的另一个侧面。金属离子或者配合物，一旦进入到细胞内，若有必要，生物代谢成一个活性形式，它必须自己找到目标位置并发生必要的化学治疗反应。并且，为了避免导致意外毒性，要尽可能地不与其他目标结合。虽然这个课题还处于萌芽阶段，通过对顺铂的研究已经在研究战略方面获得了一些信息。

在第5章和第7章我们已经看到，与DNA发生相互作用从而形成内联(intrastrand) d(GpG)和d(ApG)交叉偶联的，是被水解的顺铂的阳离子形式，这构成了所有加合物的90%。这种高级区域专属性，远远大于近旁的嘌呤核苷，它似乎是既受到热力学因素的控制，也受到动力学因素的控制。双链(double-stranded) DNA的静电势的理论研究表明，嘌呤的N7位置最具亲核性。随着带正电荷的*cis*-$[Pt(NH_3)_2Cl(H_2O)]^+$配合物接近于双重位点或双螺旋(duplex)，它沿着糖磷脂骨架移动，直到找到最具负电性的静电势，即一对临接嘌呤残基。因此，该药物的区域专属性，部分是受到对DNA的最具负电性部分的热力学优选所控制的。对嘌呤氮面非磷脂氧供体的优选，反映了Pt(Ⅱ)配位于较软供体配体的强烈倾向。

但是，动力学因素也是很重要的。在铂配位界内只有一个位置被一个DNA给体原子所占据而生成单功能加合物，然后关环生成内绞交叉偶合物。利用^{195}Pt NMR谱(图8.2)研究了单功能加合物的时间与生成的关系。Pt-195核($I = 1/2$)的化学位移对配位环境的本质相当敏感，能被用于监测DNA上氮供体逐步取代非氨配位的取代反应。如图8.2所示，分开得很好的^{195}Pt共振出现在对应于两个不同类型加合物的反应时间过程中。动力学分析揭示，单功能加合物关环生成双功能加合物的半衰期为2 h。该值是Pt(Ⅱ)配合物中氯化物配位水解所需的特征时间。它强烈地暗示水分子取代Cl^-是速决步骤，随后配位水分子被嘌呤的N7供体以

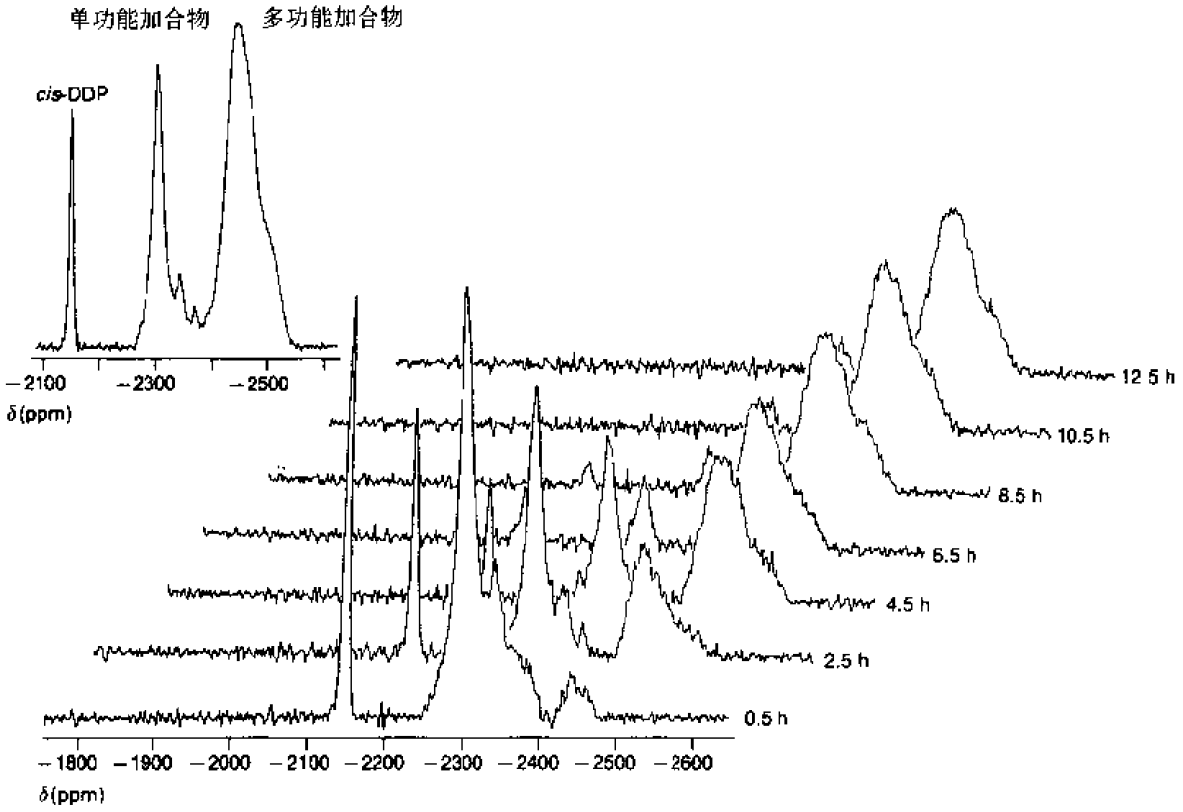


图 8.2　在声波定位的小牛胸腺 DNA 的存在下，顺铂的时间相关^{195}Pt NMR 谱变化

≈−2300 δ 的信号对应于 DNA 碱基腺嘌呤和鸟嘌呤的氮供体原子上单功能加合物，而≈−2450δ的信号对应于双功能加合物[摘自D. P. Bancroft et al.，*Journal of the American Chemical Society* 112，6860～6871(1990)]

更快的速率(≈8 min)所取代。晶体结构测定研究表明，d(pGpG)单元的 5′侧面上磷脂氧原子与铂原子上的氨合物配位(图 7.18)形成氢键。因此一个合理假设是，这种相互作用(氢键)帮助将顺-二氨合铂(Ⅱ)单元引导到它在 DNA 上的位置。

最近，*cis*-$[Pt(NH_3)(CyNH_2)(H_2O)_2]^{2+}$($CyNH_2$ 为环己胺)结合 DNA 的研究结果进一步支持了上述假设。这是一种刚刚进入临床实验的新型口服抗癌药 Pt(Ⅳ)化合物，是 *cis*、*trans*、*cis*-$[Pt(NH_3)(CyNH_2)(CH_3CO_2)_2Cl_2]$配合物的推测活性代谢物。

当 *cis*-$[Pt(NH_3)(CyNH_2)(H_2O)_2]^{2+}$结合到 DNA 时，根据环己胺配体是取向于 5′或者 3′核碱，以 2∶1 的比例作为主要加合物形成了内链 d(GpG)交叉偶联的两个方向异构体。利用 NMR 测定了 *cis*-$[Pt(NH_3)(CyNH_2)d(GpG)]^{2+}$中^{15}N-富集胺配体和鸟嘌呤配体的 $J_{N,N}$偶合常数。结果表明，主要异构体中胺配体取向于 5′一边，该取向最大限度地增大了与磷脂氧原子(比较图 7.18)的氢键相互作用。

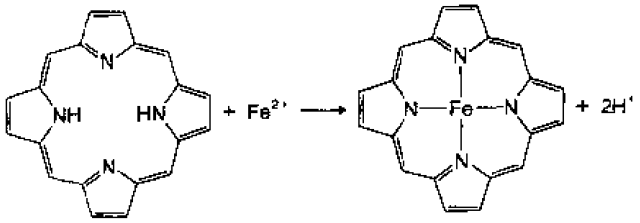
这些结果表明，决定着金属离子插入到蛋白质中自然结合位置的许多原理，也同样适用于顺铂与它在 DNA 中目标位置的相互作用。

8.4 生物高分子促进的金属-配体的相互作用

蛋白质和核酸本身能够催化或者促进金属离子与配体的选择反应。我们这里将通过两个例子来描述这个原理。第一个体系涉及到将金属离子插入到卟啉的蛋白质；第二个例子利用双绞 DNA 作为模板，促进有机嵌入体的胺基取代基取代铂上的配体。

8.4.a 亚铁螯合酶

式 8.2 所示的金属化反应在体外实际上是很难进行的，往往要求高温以达到可以接受的速率：



(8.2)

亚铁螯合酶已经被证明能催化这种反应。此酶的质量为 40 kDa，在饱和量底物的存在下，催化周转率大约在每小时 250～2500 次。这个速率比毫摩尔浓度的金属离子的无催化反应速率快 4 个数量级。但是，这个酶对于某个特定的金属离子没有很高的专属性，它插入 Zn^{2+} 离子的速率和插入 Fe^{2-} 的速率基本相同。尽管这个酶作用的详细机制还不清楚，通过鉴定一个有效的抑制剂已经获得了一些振奋人心的结果。N-甲基原卟啉 IX 抑制亚铁螯合酶非常有效，K_i 为 7 nmol/L。如图 8.3 中的一个 Zn(Ⅱ) 配合物所示，由于和 N-烷基的立体相互作用，N-烷基卟

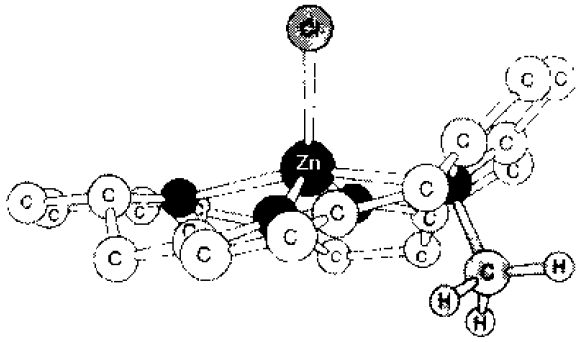


图 8.3 一个 N-甲基卟啉的锌配合物的结构，卟啉环发生了畸变

啉的结构表征揭示它们是明显的挠曲四边形，或者叫拱曲。基于这样的观察结果，内消旋 N-甲基卟啉 IX 曾被用作一个半抗原，产生如图 8.4 所示的单克隆抗体。曾经假设，这种抗体可能通过如图8.3所示的方式，吡咯氮原子将它们结合在拱曲构型中，从而催化相关单烷基化卟啉的金属化反应。事实上，这种途径产生了一种这样的抗体，该抗体所催化的反应动力学可以用式 8.3表示：

$$Ig + P \xrightarrow{K_M} Ig \cdot P \xrightarrow[M^{2+}]{k_{cat,app}} Ig \cdot PM \xrightarrow{K_P} Ig + PM \tag{8.3}$$

式中 Ig 为抗体，P 为没有金属化的卟啉，PM 为金属化的卟啉(图 8.5)。当 $M^{2+} = Zn^{2+}$，浓度为 1 mmol/L 时，发现动力学参数为：$K_M = 49\ \mu mol/L$，$K_P = 2.9\ \mu mol/L$，催化周转数为每

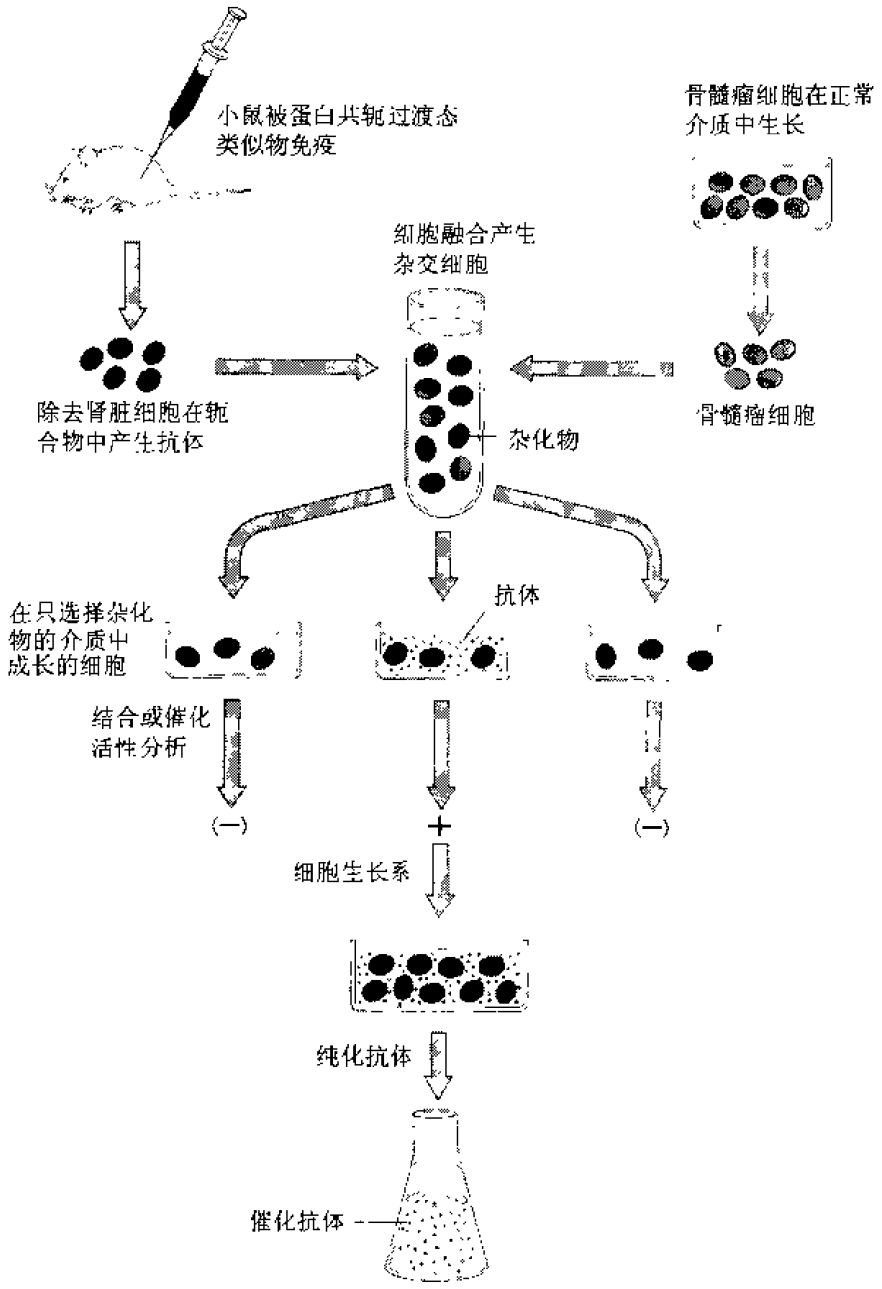


图 8.4　制备催化单克隆抗体的路线示意图

小时 80 次。因此，催化抗体和亚铁螯合酶有许多共性。如期望的一样，它被半抗原内消旋 N-甲基卟啉强烈抑制。另外，在所有情况下，卟啉底物和产物结合类似地在10 μmol/L范围内。最大的区别涉及到与金属离子有关的动力学参数。虽然亚铁螯合酶和抗体两者都插入 Zn^{2+}，对于抗体是个很好底物的 Cu^{2+}不插入到该酶中。事实上，酶除了具有和卟啉结合位置以外还要有一个金属结合位置。上述的金属专属性的不同可能与这个事实有关。在金属离子浓度低的情况下(K_M^{Zn}= 32 μmol/L)，酶产生最大限度的催化周转数；而在金属离子浓度为 1 mmol/L 时，抗体的催化周转数没有表现出饱和的迹象。这个例子说明了，催化抗体途径是如何为了解自然发生的酶功能提供信息，同时表明了插入酶工作的一种机制。

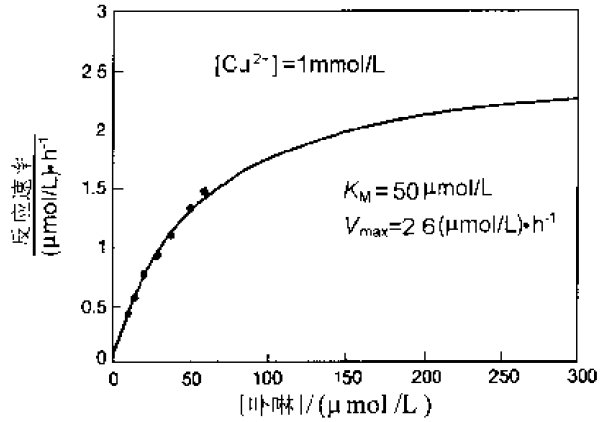


图 8.5　抗体催化的 Cu^{2+} 插入到内消旋卟啉的动力学研究

图中点代表实验数据；图中曲线对应于拟合 Michaelis-Menten 动力学，K_M 和 K_{max} 值如图中所示［摘自 A. G. Cochran and P. G. Schultz, *Science* 249, 781～783 (1990)］

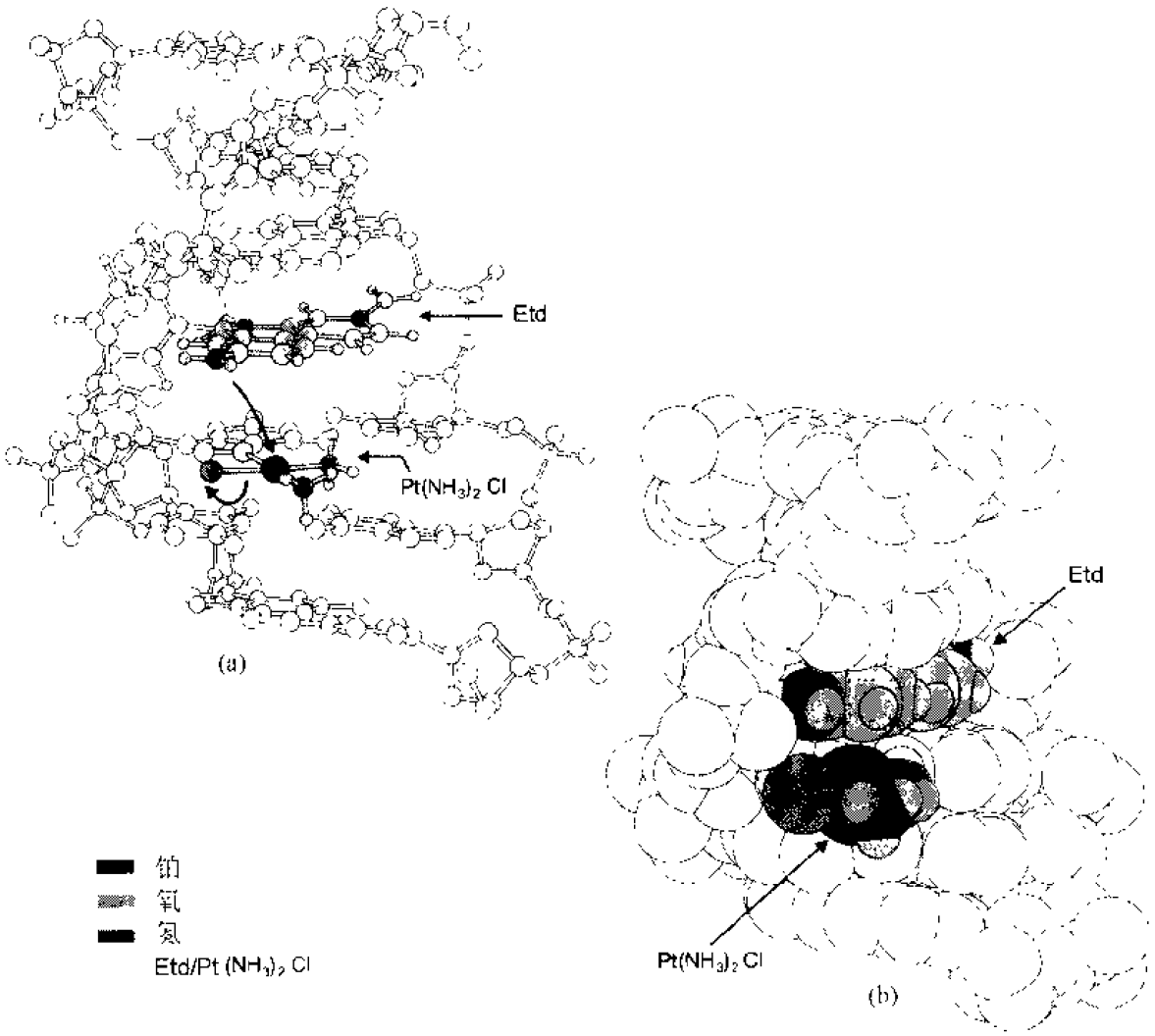


图 8.6　DNA 双链、3,8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶鎓、和顺-二氨氯化铂(Ⅱ)三元配合物的球-棍(a)及空间填充(b)示意图

其中 3,8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶鎓与铂配合物形成了共价键，DNA 使 Etd 的环外氨基处在 S_N2 取代铂上氯离子的几乎完美的位置

8.4.b DNA 促进的反应化学

在化学治疗中所使用的许多化合物被作为药物养生的一部分而管理，这样产生了比从单个药物效果的加和更好的结果。为了找出在和细胞内假设的目标分子反应过程中是否产生协同效果，这种协同增效作用促使研究人员考察顺铂和嵌入体在结合到 DNA 时的相对效果。尤其是研究了 3,8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶鎓(Etd，图 4.3)和顺铂对 DNA 的结合。在没有 DNA 存在和 10 μmol/L 低浓度的情况下，Etd 对顺铂仅仅有非常小的共价结合。然而，当在 DNA 的存在下将二者混合之后，部分铂化合物在 DNA 上嘌呤核碱基与 Etd 环上环外氨基之间形成了共价交叉连接。通过对与 DNA 单功能结合的顺铂和临近位置上嵌入结合的 Etd 结构几何分析，获得了对该 DNA 促进反应化学的合理假设。如图 8.6 所示，这种排列中的环外氨基处在进行 S_N2 取代与铂结合的氯离子的完美位置。另外，因为 Etd 能沿着 DNA 移动，与结合铂相遇的机会要显著地多于二者作为溶液中自由分子时的碰撞频率。这种现象同样可以提高反应速率。

最近发现一个单功能顺铂 DNA 加合物与嵌入药物 N-甲基-2,7-二氮杂芘鎓盐(diazapyrenium)发生反应，该嵌入配体的铂配合物能从生物高分子中解离。因此，DNA 甚至可能催化金属配合物的生成。尽管定量地表述并拓展这些发现还有很多工作要做，这些发现还是表明了，生物高分子能起到将两个具有潜在反应活性的小分子进行有利分布的模板作用，甚至将它们排列，从而促进它们之间的催化反应。利用目标生物高分子使一个试剂更容易生成，并且该试剂最终自我毁灭。这些原理能用于设计新的药物分子。

习　题

1. 假设你想建立一个含有惰性金属离子 Co(Ⅲ)的金属蛋白活性位置，设计一个将该金属离子结合到这个位置上的方法。
2. 如果上述问题中所设计的位置要起到可逆传输氧分子的作用，你将利用什么样的氨基酸残基？在回答该问题时，请记住本章讨论过的电中性原理以及主体分子的形式氧化态在与金属结合时可能发生变化。
3. 血浆铜蓝蛋白是一个具有氧化还原活性的蛋白，它被认为是铜转移和储存所必需的。最近人们推测，血浆铜蓝蛋白可能在将铁装载到铁蛋白中时起着至关重要的作用(见第 6 章)。请推测血浆铜蓝蛋白是如何实现该功能的。
4. 电子给体和电子受体配合物，如 ML_3^{n}，这里 L 为联吡啶或一个有关的配位，M 为光活化的 Ru(Ⅲ)(给体)或 Co(Ⅲ)(受体)。在双绞 DNA 的存在下研究了电子供体和电子受体配合物之间的反应。你是否预计光诱发电子迁移的速率常数与在没有核酸存在下溶液中测得的速率常数不同？为了调查研究 DNA 可能起到的作用，讨论你将可能进行的实验。
5. 利用扫描量热法研究了铜蓝蛋白(azurin，见 9.1.b 节)的金属结合选择性。在这个方法中，升高含有蛋白的样品温度，同时追踪测量被吸收的热量。在某个特定的温度，对应于蛋白的溶化温度(蛋白变成非折叠)，大量的热被吸收。对于原 Cu(Ⅱ)蓝蛋白，总热量 87.8 J/g (即 21 cal/g)被吸收；对于 Ni(Ⅱ)取代的蓝蛋白，只有 41.8 J/g (即 10 cal/g)的热量被吸收。哪一种金属离子结合得更为牢固？从配位场稳定化能的角度对于一个近似四面体位置解释上述观察结果。

参 考 文 献

金属离子对蛋白质位置的选择和插入

D. Chatterji and F. Y.-H. Wu. 1982. "Selective Substitution In Vitro of an Intrinsic Zinc of *Escherichia coli* RNA Polymerase with Various Divalent Metals." *Biochemistry* 21, 4651~4656.

R. P. Hausinger. 1990. "Mechanisms of Metal Ion Incorporation into Metalloproteins. *Biofactors* 2, 179~184.

D. K. Lavallee. 1987. *The Chemistry and Biochemistry of N-Substituted Porphyrins*. VCH, Weinheim, 181~209.

K. Mokhele, Y. J. Tang, M. A. Clark, and J. L. Ingraham. 1987. "A *Pseudomonas stutzeri* Outer Membrane Protein Inserts Copper into N_2O Reductase." *J. Bact.* 169, 5721~5726.

W. G. Zumft, A. Viebrock-Sambale, and C. Braun. 1990. "Nitrous Oxide Reductase from Denitrifying *Pseudomonas stutzeri*: Genes for Copper-Processing and Properties of the Deduced Products, Including a New Member of the Family of ATP/GTP-Binding Proteins." *Eur. J. Biochem.* 192, 591~599.

金属离子和金属配合物与核酸的结合

S. L. Bruhn, J. H. Toney, and S. J. Lippard. 1990. "Biological Processing of DNA Modified by Platinum Compounds," in S. J. Lippard, ed., *Progress in Inorganic Chemistry*, Volume 38. Wiley-Interscience, New York, 477~516.

J. F. Hartwig and S. J. Lippard. 1992. "DNA Binding Properties of *cis*-$[Pt(NH_3)(C_6H_{11}NH_2)Cl_2]$, a Metabolite of an Orally Active Platinum Anticancer Drug." *J. Am. Chem. Soc.* 114, 5646~5654.

生物高分子促进的金属-配体相互作用

A. G. Cochran and P. G. Schultz. 1990. "Antibody-Catalyzed Porphyrin Metallation." *Science* 249, 781~783.

H. A. Dailey and J. E. Fleming. 1983. "Bovine Ferrochelatase-Kinetic Analysis of Inhibition by N-Methylprotoporphrin, Manganese, and Heme." *J. Biol. Chem.* 258, 11453~11459.

D. K. Lavallee. 1988. "Porphyrin Metalation Reactions in Biochemistry." *Molecular Structures and Energetics*. 9, 279~314.

J.-M. Malinge, M. Sip, A. J. Blacker, J.-M. Lehn, and M. Leng. 1990. "Formation of a DNA Monofunctional *cis*-Platinum Adduct Cross-Linking the Intercalating Drug N-methyl−2,7−diazapyrenium." *Nucleic Acids Res.* 18, 3887~3891.

W. I. Sundquist, D. P. Bancroft, L. Chassot, and S. J. Lippard. 1988. "DNA Promotes the Reaction of *cis*-Diamminedichloroplatinum(II) with the Exocyclic Amino Groups of Ethidium Bromide." *J. Am. Chem. Soc.* 110, 8559~8560.

N. J. Turro, J. K. Barton, and D. A. Tomalia. 1991. "Molecular Recognition and Chemistry in Restricted Reaction Spaces: Photophysics and Photoinduced Electron Transfer on the Surfaces of Micelles, Dendrimers, and DNA." *Acc. Chem. Res.* 24, 332~340.

第 9 章　电子转移蛋白

9.1　电子载体
9.2　远程电子转移
9.3　电子转移与距离及驱动力的相关性

载电子蛋白中的金属结合部位，哈使氧化水平改变引起的结构重组降低到最小。单电子转移过程通常是首选的。质子和电子转移的偶合，为氧化还原电位的控制提供了一种量度。铁和铜是最常用的两种金属。电子可通过远程(>10Å)传递。在测定蛋白质电子转移速率中，重组能、距离和驱动力是几个最重要的参数。在有些体系中，介质效应格外敏感，甚至可能起决定性的作用。

迄今为止，我们已了解到金属离子是如何由细胞携带，并插入蛋白质、核酸和辅因子适当部位的。这一章及随后的三章，我们将转而讨论金属蛋白质的特殊功能，即电子转移、底物的结合与活化及原子和基团转移的化学。在许多蛋白质中，生物大分子对相同或类似金属中心性能的协调能力是一个重要的性质，因此也将详细讨论。

9.1　电 子 载 体

在形式上，所有的化学转移反应，都可从性质上被划分为酸碱或氧化还原反应两大类。在第 10 章，我们将讨论那些被金属酶所催化、底物不发生氧化-还原态变化的纯酸碱反应。在第 11 章，将讨论原子和基团转移的反应。在后一类变化中，通常同时具有酸碱和氧化还原的成分。本章要讨论的，则在性质上纯属氧化还原反应，其中包括电子从一种蛋白质到另一种蛋白质的转移。若干类电子转移蛋白已被详细地研究过，而这些正是我们要讨论和比较的。

9.1.a　铁-硫蛋白

铁-硫蛋白中含金属的单元已在 5.3.a 节广泛地讨论过了。表 5.2 列出了几类已知的铁-硫蛋白和它们的某些物理性质。在大多数这些蛋白中，铁-硫簇的主要功能是推动电子转移，然而，Fe_nS_m 单元所具有的那种很明确的催化功能，如双氮或亚硝酸盐的还原，柠檬酸和异柠檬酸间的相互转化，甚至像 DNA 特定部位的水解功能，现已在多种酶中发现。这些酶往往是（但不总是）具有附加的金属中心，而原子的转移反应正在这里发生。在活性部位上仅有一个铁-硫中心的酶中，表征得最好的实例是乌头酸酶。有意思的是，被这种酶催化的反应在任何一步都不含电子转移过程，但却用到了一个和纯氧还铁-硫蛋白中发现的几乎等同的单元。一个和 IRE-结合蛋白中类似单元的功能，曾在第 6 章讨论过，而乌头酸酶本身则将在第 12 章涉及到。

此处我们仅着眼于铁-硫蛋白作为电子转移剂的功能上。用以分离和纯化这些蛋白的方法仅有历史意义。在生物化学中，鉴定蛋白质的传统方法是测定酶的活性，而活性随纯度的提高而增加。纯化酶有一套方法，如柱层析、凝胶电泳和分级沉淀法。运用现代分子生物学的手段，

纯蛋白常通过克隆基因表达或 cDNA 碎片来制备。由于铁-硫蛋白不具备酶的活性，分离提纯在很大程度上依赖于物理的而不是化学的方法，特别是电子自旋共振谱(表 5.2)。所幸的是，如前所述(4.4.a 节)，高灵敏度的 EPR 法能检测和剔除杂质，筛选出某些纯净的铁-硫蛋白晶体试样。

铁-硫蛋白的氧化还原化学和与 nFe-mS 核相对应的合成模型已广为研究。已知的四类铁-硫蛋白，将按簇合物中铁原子数目增加的顺序依次讨论。

(i) [1Fe-0S]。正如 5.3.a 节所指出的那样，红氧还蛋白(rubredoxin)的活性部位含一个高自旋的 Fe(Ⅱ，Ⅲ)离子，它与 4 个半胱氨酸根的硫原子配合，处于近似四面体的排布。现已解出几种从不同的细菌源中获得的红氧还蛋白的晶体结构，并运用高分辨率(1.0～1.5 Å)X 射线衍射数据得到了精确的结构。其中 Fe-S 平均距离都几乎等同，均在实验误差范围内，数值接近 2.28 Å。这个距离与合成的类似化合物二(邻-二甲苯基二硫醇根)铁(Ⅲ)中的数值极其吻合。在该化合物中，Fe-S 平均距离为 2.267 Å。Fe(Ⅱ)形式的红氧还蛋白的还原形结构尚未被广泛地研究过。氧化形和还原形的 *P. aerogenes* 红氧还蛋白的 EXAFS 研究表明，Fe-S距离从 2.26 Å 增加到 2.32 Å。后一种距离仍和从模型配合物如二(邻-二甲苯基二硫醇根)铁(Ⅱ)和四(苯硫醇根)铁(Ⅱ)中得到的数据一致，其中 Fe-S 平均距离接近 2.36 Å。综上所述，红氧还蛋白及其模型配合物的结构数据表明，通过还原，铁中心并无大的变化。高铁和亚铁型间的差别仅在于 Fe-S 距离有 2%～3%的增加，而配位数和自旋态均无变化。红氧还蛋白的还原电位通常在－50～＋50 mV 间。

(ii) [2Fe-2S]。*S. platensis* 铁氧还蛋白(ferredoxin)的晶体结构揭示了$\{Fe_2S_2(S\text{-}Cys)_4\}$单元的存在。正如 5.3.a 节所述，这个双核簇的结构是在用 X 射线晶体法测定前，通过物理化学的实验推断的。此外，合成的模型配合物在该蛋白的结构报道之前就已制备出来，并进行了结构和波谱的表征。在氧化形中，该部位含 2 个 Fe(Ⅲ)离子，每一个均为四面体配位，其中 2 个为桥式硫基，2 个为端梢的半胱氨酸硫醇根。Fe-Fe 距离 2.70 Å，Fe-S-Fe 键角接近 75°，反映了其中明显的存在金属-金属键。看来，含此类中心所有的生理过程都经历单电子转移，形成混合价态 Fe(Ⅲ)-Fe(Ⅱ)。无论是蛋白质还是模型的这种价态，尚无详细的结构信息，尽管 EXAFS 的研究提出 Fe-Fe 距离增加到 2.76 Å。这两个铁中心呈反铁磁性偶合，单电子则离域在两个铁的位置上。穆斯鲍尔谱的研究表明，在该时标上电子交换缓慢(见表 4.1)。对还原形模型配合物的类似研究证实了同样的结果，表明了这种不对称性，即存在 2 个分立的但又相互转化的 Fe(Ⅲ)和 Fe(Ⅱ)中心，而不是完全离域的体系。此为簇合物固有的性质，并非蛋白质强加的。这种含两个铁中心蛋白质的还原电位，比单核中心的更负，在－280～－490 mV 的范围内。

(iii) [3Fe-4S]。导致对铁-硫蛋白中 3-Fe 中心表征的事实曾在 5.3.a 节述及。目前，几种含 $Fe_3S_4(S\text{-}Cys)_3$ 单元蛋白的精确的晶体结构已确立。上述单元可简单地想像为 Fe_4S_4 立方体缺一角(见式 5.2)。3-Fe 中心的氧化形含 3 个 Fe(Ⅲ)离子。EPR 和穆斯鲍尔谱与 3 个等同的铁原子一致，而总自旋为 1½。因此，这 3 个高自旋的 Fe(Ⅲ)离子为反铁磁性偶合，所形成的体系在基态有一未成对的电子。该单元的结构与明显具有铁-铁键的结构一致，正如上述在双核部位中发现的那样。该中心的还原形含两个 Fe(Ⅲ)离子和一个 Fe(Ⅱ)离子。穆斯鲍尔谱表明存在一个高自旋的 Fe(Ⅲ)中心和一对等价的位置，净的氧化态接近 $Fe^{+2.5}$。三核簇的总自旋态为 $S=2$。上述结果可用铁中心间的反铁磁性偶合加以解释。

D. gigas 铁氧还蛋白Ⅱ的电位为－130 mV。最近，*A. vinelandii* 铁氧还蛋白 I 的氧化还原

电位已直接用电化学的实验测定(见 4.8 节)。最初,曾经提出上述蛋白中的[4Fe-4S]簇和[3Fe-4S]簇分别在电位为+0.320 和−0.424 V 时进行单电子转移反应,但由此引发的疑问是:究竟是什么可能的因素在起作用,需要如此悬殊的电位?直到发现用于氧化还原滴定的试剂$K_3[Fe(CN)_6]$能破坏[4Fe-4S]簇,产生一巯基时,才证明最初的推测是错误的。这个例子证明了确信金属蛋白在经历任何物理测定后,仍保持它天然的组成和结构的重要性。图 9.1 表示了 *D. africanus* 铁氧还蛋白Ⅲ在 pH 为 7.0、以热解石墨作电极时的循环伏安图。一对 A′相当于[3Fe-4S]簇的单电子还原,$E_{1/2}=(-110\pm10)$ mV,它依赖于 pH,即

$$dE_{1/2}/d(pH)=-55\ mV$$

后一结果表明每个质子夺取一个电子。一对 B′表示$[4Fe\text{-}4S]^{2+}$在电位为 (−400±10) mV 时还原为$[4Fe\text{-}4S]^{+}$簇(见下一节)。在−695 mV 下,相应于一对 C′的氧化还原过程,曾被假定为$[3Fe\text{-}4S]^{0/2-}$的还原。

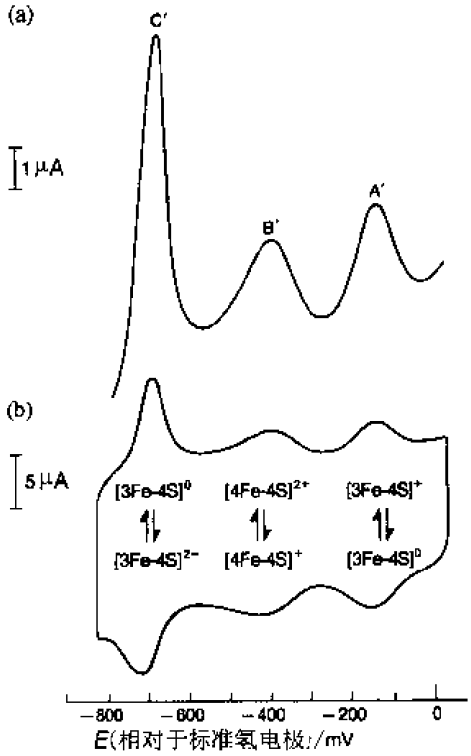


图 9.1 由 *D. africanus* 提取的铁氧还蛋白在热解石墨电极上的微分脉冲极谱图(a)和循环伏安图(b)

图中示出了三种电子转移过程的表征[引自 A. J. Thomson et al. *Biochemical Society Transactions* 19,594~599(1991)]

(iv) [4Fe-4S]。最后一种经充分表征的铁-硫中心具有 Fe_4S_4 立方烷型的结构。这类簇合物可看作是两个 Fe_2S_2 单元的二聚体。它是在植物型铁氧还蛋白中发现的,其中的巯基和 3 个而不是两个铁中心桥联。这种结构已在多种不同的蛋白质中观测到,它们或是单独的或是在其他辅基存在时出现。铁-铁距离再次接近 2.7Å。该单元区别于上述其他中心的最显著的特征之一,是它能以三种而不是两种氧化水平存在。此外,它产生于不同的蛋白质中。*P. aerogenes* 铁氧还蛋白含 2 个 $Fe_4S_4(S\text{-}Cys)_4$ 簇合物,每个簇合物的氧化态,形式上含 2 个 Fe(Ⅲ)离子和 2 个 Fe(Ⅱ)离子,相当于在 Fe_4S_4 单元上的总电荷为+2。该体系实际上是电子离域的,它具有

4 个等价的铁中心，平均氧化态为+2.5。这些簇合物能被还原为 $Fe_4S_4^{1+}$ 单元，形式上含 1 个 Fe(Ⅲ)和 3 个 Fe(Ⅱ)离子，其中的电子也是离域的。相反，*Chronatium* 铁氧还蛋白(过去称为高电位铁蛋白或 HiPIP)的还原形含 1 个 $Fe_4S_4^{2+}$ 单元，氧化形则含 1 个 $Fe_4S_4^{3+}$ 单元，形式上为 3 个 Fe(Ⅲ)和 1 个 Fe(Ⅱ)离子。

通过大量的波谱和化学数据，才认识到 $Fe_4S_4(S\text{-}Cys)_4$ 单元能以两种以上的氧化水平存在，它们可用以区别两类细菌的铁氧还蛋白。其总电荷和氧化水平，只有在制备并表征了相应部位的合成模型后才得以测定，仅靠蛋白质的晶体结构是不能实现的。这些模型配合物还揭示了各种氧化水平的若干重要性质，包括：

(i) $Fe_4S_4^{2+}$ 核在性质上相对单一，它的结构沿轴向略为压缩，使对称性由 T_d 降至 D_{2d}；

(ii) $Fe_4S_4^{+}$ 核对环境的影响颇为敏感，它的结构，甚至基态的自旋态都随晶体环境的改变而变化；

(iii) $Fe_4S_4^{3+}$ 的形式很难稳定，但若有很大的硫醇根基团，则能制备出它的模型并加以表征，甚至能用 X 射线晶体法加以测定。

$Fe_4S_4(SR)_4^{n-}$ 簇每个铁原子结构的变化比单铁型中心的小。在典型的 $[Fe_4S_4(SR)_4]^{-}$、$[Fe_4S_4(SR)_4]^{2-}$ 和 $[Fe_4S_4(SR)_4]^{3-}$ 簇合物中，平均铁-硫距离分别为 2.25 Å、2.28 Å 和 2.31 Å，相当于每加入一个电子，改变 1.3%；而对于单核的中心，则改变 2%～3%。图 9.2 表示了当 R=Ph(或 Ph 的取代基)时，所观测到的结构随氧化和还原作用的变化。

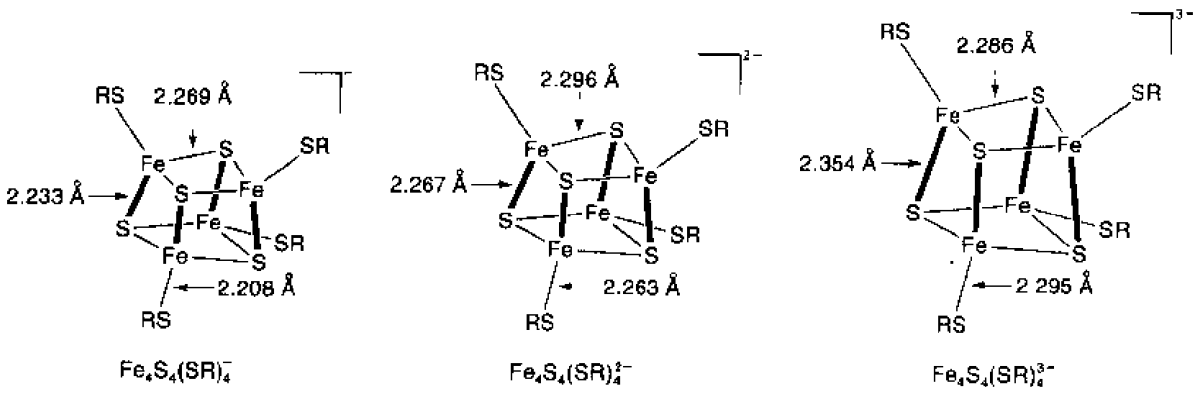


图 9.2 $[Fe_4S_4(SR)_4]$ 簇合物(R=芳基)的结构

该结构作为总电荷的函数，后者由合成模型通过晶体学演绎而来(两种氧化程度较高的簇合物在一个方向上略为压缩，而还原程度最高的一个则沿一个方向上有所拉长)

由 $Fe_4S_4^{1+}$ 和 $Fe_4S_4^{3+}$ 单元的单电子性而来的顺磁性，促成了用 EPR 谱对它们的识别(表 5.2)。这种顺磁性也使半胱氨酰残基的 β-CH_2 共振，产生了较[4Fe-4S]$^{2+}$态大的顺磁位移。上述蛋白也曾用广延共振拉曼光谱进行过研究，某些 Fe-S、Fe-SR 和簇合物相应的形式在谱中用 245～400 cm^{-1} 范围表征。对[4Fe-4S]蛋白物理生质的综合研究，使得从它们特征的磁学和谱学信号中来鉴别它们变得相对容易些。

含[4Fe-4S]单元蛋白的氧化还原电位的范围跨度极大，这是因为它们的三种氧化水平接近。蛋白质处于 $[Fe_4S_4]^{+}$ 和 $[Fe_4S_4]^{2+}$ 水平之间，电位的范围从 −650～−280 mV，而当用 $[Fe_4S_4]^{2+}$ 和 $[Fe_4S_4]^{3+}$ 时，则接近+350 mV。对合成模型的研究，证明某些效应能调节这些蛋白。例如，$[Fe_4S_4(SCH_2CH_2OH)_4]^{2-/3-}$ 和 $[Fe_4S_4(S\text{-}Cys\text{-}(Ac)NHMe)_4]^{2-/3-}$ 转换的电位就比相

应蛋白的转换中点稍微偏负些，表明蛋白质基质使电位向更正的数值位移了≈60～80 mV。

另一个重要的量，即电子转移速率常数，已从模型化合物上测得，不久便会发展得更完善。在金属蛋白中，从表面到氧还活性金属中心的远程电子转移，在目前的生物无机化学中，是一个令人颇感兴趣的课题。对于铁-硫蛋白主要的功能，其中包括电子转移，基本的是要了解决定这类反应速率的因素。研究双分子$[Fe_4S_4(SR)_4]^{n-}$的外界速率常数，已能方便地通过观测簇合物由 $n=2$ 到 $n=3$ 态电子转移引起的^{1}H NMR峰形的变化来进行。它的速率常数在 10^6～10^7 $(mol/L)^{-1}\cdot s^{-1}$范围内，从而使$[Fe_4S_4]$立方体的电子转移速率，在无机化学中属于已知的自交换过程较快的一类。当[4Fe-4S]$^{n-}$蛋白进行 $n=2$ 到 $n=3$ 的转变时，上述数值比已知最快的电子转移速率还要大 10^3 以上。通过模型化合物得到的这些研究结果，导致对[4Fe-4S]簇合物作如下描述，即电子转移速率快，此与簇合物的重组能极低相符。实际的电子转移速率为铁-硫核外在的因素所控制。

9.1.b 蓝铜蛋白

第二类重要的担负电子转移反应的蛋白是蓝铜蛋白(blue copper protein)。这种措词可能是多余的，因为许多铜(Ⅱ)的配合物，如$[Cu(H_2O)_6]^{2+}$，都是蓝色的。然而，和二价铜简单化合物的颜色相对应的吸收带，其典型的消光系数为 5～10$(mol/L)^{-1}\cdot cm^{-1}$。但蓝铜蛋白的特征峰则出现在 600 nm 左右，并且强得多，消光系数＞3000$(mol/L)^{-1}\cdot cm^{-1}$。图 9.3 示出了一

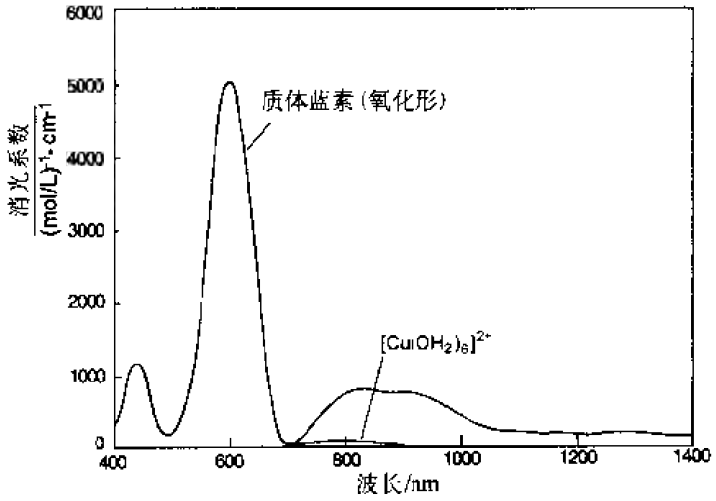


图 9.3 氧化形质体蓝素和六水合铜(Ⅱ)离子电子光谱的比较

例。由于对这种颜色特别深的起因感兴趣，激励了许多人去研究这些蛋白中金属结合部位的性质。进一步的研究证实了某些其他值得注意的谱学性质，其中最著名的就是蓝铜蛋白的 EPR 谱(见 4.4 节和图 4.5)反映了若干不寻常的性质，包括高 g 值和低 A 值，意味着未成对电子比在其他铜(Ⅱ)配合物中更具有离域性。蓝铜中心既存在于较小的含单个铜离子的蛋白质，如质体蓝素(plastocyanin，来自植物)和蓝蛋白(azurin，来自细菌)中，也存在于复杂的酶(多铜氧化酶)中，后者在多种可识别的位置上含 4 个或更多的铜离子。蓝铜蛋白中铜的部位通常称为类型 1，正如第 4 章所描述的那样。

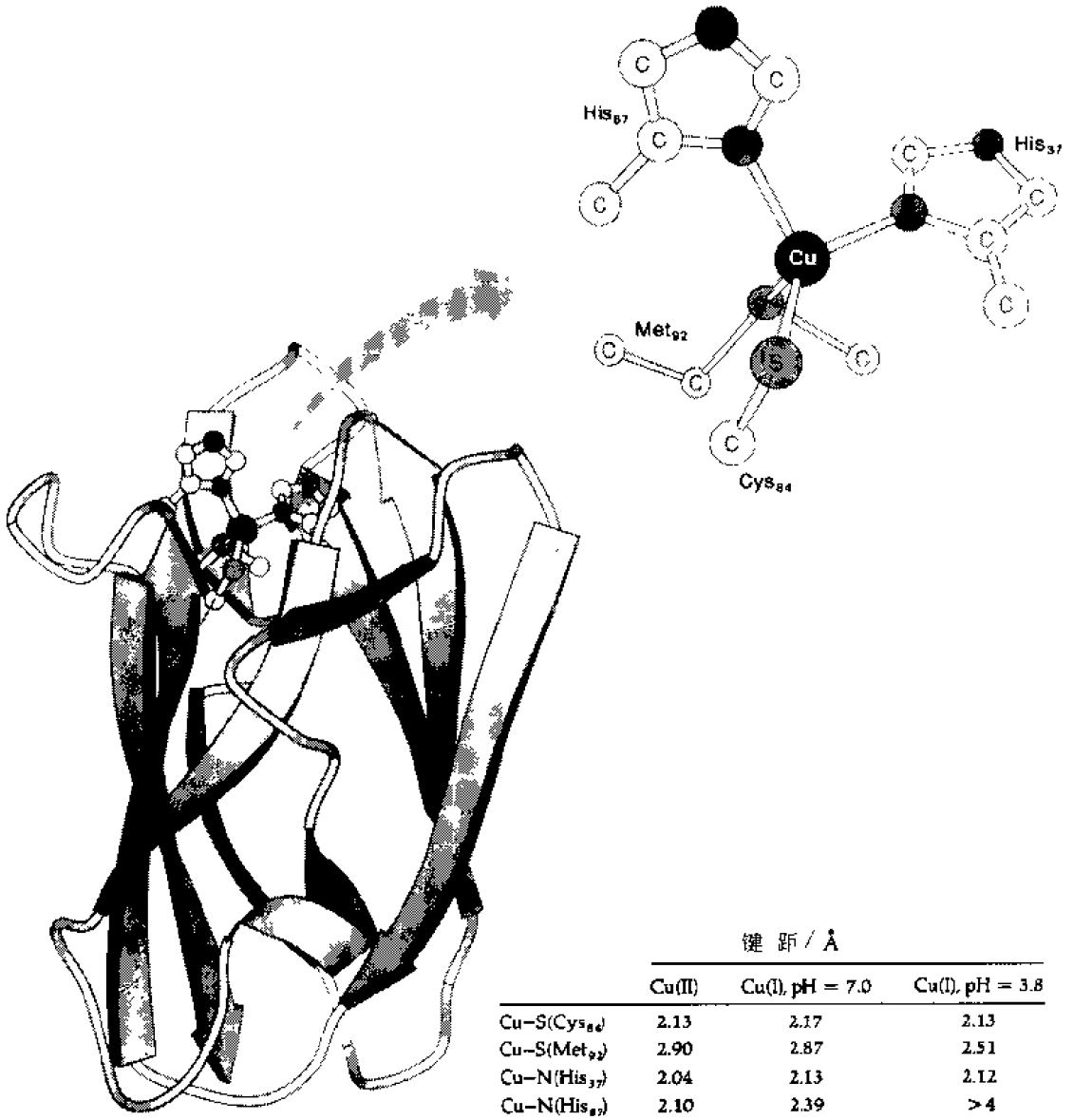
在用 X 射线晶体法测定某些蓝铜蛋白的结构以前，已经进行过多种波谱研究以阐明含铜部位的几何构型。光学、光电子、核磁共振和 X 射线吸收光谱均起了重要的作用。这些研究一

般都依赖于利用蛋白质存在一种以上的氧化还原态，从而比较它们的波谱性质。对天然蓝铜蛋白的光学研究和对衍生物一样，当其中的铜离子被其他金属取代时，得到某些与强可见吸收带起因有关的重要结论，意味着硫醇根是铜(Ⅱ)离子的一个配体。如前所述，这些蛋白质特征吸收带的位置，发生在能量与许多五配位和六配位的铜(Ⅱ)配合物 d-d 带类似处，然而，它的高强度又使得表征为 d-d 跃迁让人难以置信。考察某些蓝铜蛋白钴(Ⅱ)的衍生物，证明了上述吸收带的存在，其强度和 Cu(Ⅱ)的类似物相似，但出现在大约 300～350 nm 处。从 Cu(Ⅱ)到 Co(Ⅱ)向能量较高的方向转移，和从配体到金属的电荷转移带跃迁的表征一致。根据上述电荷转移跃迁的位置，可以认为给体大概是硫醇根。为了补充提供 Cu(Ⅱ)配合物这种不寻常可见带的表征，又通过对 Cu(Ⅱ)形式近红外区和 Co(Ⅱ)形式可见和近红外区的配位场跃迁的分析，提出这些金属离子处于畸变的四面体几何构型中。其他支持硫醇根配位的证据，来自对结合金属和脱辅基蛋白的光电子能谱硫区域的分析。在这些研究中，发现不同形式的蛋白质中，有一个硫原子发生明显的位移。这些结果指出，在不同的形式中，有一个半胱氨酸硫原子处于十分不同的环境：在脱辅基的形式中，是质子化和游离的；而在含金属的形式中，则是脱质子并和金属结合在一起的。

对还原形菠菜质体蓝素在 D_2O 中的 NMR 谱研究表明，共振信号可表征为 2 个组氨酸残基。当蛋白质氧化到 Cu(Ⅱ)态时，共振信号消失。信号的消失可能是由于质子接近顺磁金属中心，致使信号位移和加宽。此外，把还原形蛋白质作为 pH 函数的波谱研究表明，这两个组氨酸的 pK_a 值异常的低。这些观测提供了强有力的证据，表明铜的两个给体原子为组氨酸残基咪唑基团的氮。综上所述，根据光学和红外光谱的研究所得到的数据，可以认为：在蓝铜蛋白中，金属处于畸变的四面体环境中，一个配体为半胱氨酸的硫醇根，两个为组氨酸的氮，第四个配体则建议为脱质子的酰胺氮。X 射线吸收光谱对氧化形蓝蛋白的研究，支持了上述总体结构的描述。从 EXAFS 数据得出，一个硫原子处于非常短的 2.10 Å 距离上，而 2～3 个氮原子处于 2.00 Å 的距离上。这些结果显然与所提结构的主要特征一致，但却不能明确表明第四个配体的性质。

蓝铜部位最后的结构表征，由氧化形极性质体蓝素在分辨率为 2.7 Å 时的晶体结构报道而来。铜离子处于畸变四面体的配位位置，配体由一个半胱氨酸、两个组氨酸和一个甲硫氨酸提供。随后，由分辨率更高的精确测定证实了最初的描述。上述蛋白质的结构及铜的部位示于图 9.4 中。这种 β-圆柱型的蛋白结构首先在免疫球蛋白的范畴内观测到。审视铜的部位证实了许多有趣的特性：(i) 由波谱学研究得出的结构和实际的结构十分接近。(ii) 铜-半胱氨酸根硫键确实很短，正如 EXAFS 的结果所预料的那样。相反，铜-甲硫氨酸的键却很长(2.9 Å)，况且尽管作了相当大的努力，仍不能为 EXAFS 的研究所检测。这种弱的相互结合的意义尚不清楚。(iii) 铜的部位接近蛋白质表面，一个配位组氨酸残基的边缘暴露在溶剂里。在蛋白质表面铜部位附近，有一小块疏水性的区域。曾设想这小块区域可能是质体蓝素和它的氧还伙伴蛋白相互作用的位置，这方面以后还要涉及到。

其他几种蓝铜蛋白的晶体结构现已通过晶体法和 NMR 法进行了测定。例如，铜绿假单胞菌蓝蛋白的结构证实了所有蛋白质的折叠方式都十分相似。铜的部位类似于质体蓝素的情况，尽管其中的金属是五配位的，半胱氨酸和 2 个组氨酸构成三角面，而甲硫氨酸的硫和骨架上的一个酰氨氧形成长的(≈3 Å)轴向键。法国豆质体蓝素的结构也已用 NMR 法测定，测定的结构基本上和极性质体蓝素等同。上述观测虽不惊人但很重要，因为大多数的波谱和化学研究已



	键 距 / Å		
	Cu(II)	Cu(I), pH = 7.0	Cu(I), pH = 3.8
Cu–S(Cys_{84})	2.13	2.17	2.13
Cu–S(Met_{92})	2.90	2.87	2.51
Cu–N(His_{37})	2.04	2.13	2.12
Cu–N(His_{87})	2.10	2.39	>4

图 9.4　氧化形极性质体蓝素的结构和铜的部位

图中右下角的数据为质体蓝素在不同状态时铜部位的测定参数

用于法国豆蛋白的研究上。之所以选择极性质体蓝素进行晶体学的研究，是因为它是 14 种不同的质体蓝素中惟一能诱导结晶的。最后，抗坏血酸氧化酶的结构最近已被测定，它是一种含 4 个铜原子的酶：3 个铜原子组成了一个三核单元，还有 1 个铜处于类型 1 的位置上，和质体蓝素中的情况十分相似。

由于这些蛋白质参与了电子转移反应，因而考察蓝铜蛋白在还原形时的结构就变得饶有兴趣。这个目的在极性质体蓝素上获得了成功。在高 pH(pH=7.8)时，铜的部位和氧化形的蛋白质非常相似，仅在 Cu -N 键上略有拉长(图 9.4)。上述结果再次反映了和金属中心联系在一起的重组能相对而言是低的，而正是这些金属中心参与了生物学上的电子转移反应。有趣的是，当在较低的 pH(到 pH 为 3.8)重新测定结构时，发现有一个组氨酸配体质子化了，且从铜中心上解离下来。与此同时，Cu-甲硫氨酸的硫键缩短到 2.5Å。这个结果解释了早先观测到的

该蛋白质的还原电位依赖于pH。质子和电子转移的偶合，证明了一个重要的原理，即蛋白质金属中心氧化还原电位的调节受结合配体酸碱性的影响。

蓝铜蛋白中的铜离子，通常能用氰化物处理去除。用这种方法得到的极性质体蓝素的脱辅基蛋白，结晶后与含金属的形式属同晶型，表明除去金属后结构仅有微小的变化。详尽的晶体结构分析证实了预期的结果。惟一观测到的明显变化是一个组氨酸侧链改变了方向。这些结果清楚地指出，蛋白质包括它的金属结合部位，早在结合金属之前就已经组成。因此，蓝铜部位可能是张力态一个好的例子（见12.1节），其中蛋白质的结构有足够的刚性强制金属中心，而在强制力弱的分子中是很难做到的。在这个例子中，这种强制力足以使一个畸变四面体（或蓝蛋白的三角双锥）的配体排列，并稳定Cu(Ⅱ)-硫醇根单元。对许多较简单的配体，Cu(Ⅱ)和Cu(Ⅰ)配合物在结构上颇不相同，因为Cu(Ⅱ)倾向于较高的配位数（通常为5或6），四配位时则采取平面正方形的几何构型；而Cu(Ⅰ)倾向于较低的配位数，四配位的立体化学则为四面体。

曾进行过很多尝试以合成类似于蓝铜部位的产物，但成功的实例极其有限。无疑，取得进展最大的障碍是伴随着硫醇根到二硫化物的作用，硫醇根配体倾向于将Cu(Ⅱ)还原为Cu(Ⅰ)。为了消除上述作用，蛋白质把半胱氨酸根配体足够深地埋藏在多肽链中，使以上作用不至于发生。蓝铜部位类似物最好的合成实例是含满足空间需要的取代的三(吡唑基)硼酸根配体，它能提供3个给体原子和1个芳香族的硫醇根。在适当的条件下，这些配体的Cu(Ⅱ)配合物进行模拟类型1部位的光学和EPR性质，然而，它们通常在温度高于 -40℃时分解。最近，有可能结晶带有硫醇根$C_6F_5S^-$或Ph_3CS^-配体的Cu(Ⅱ)配合物。正如预期的那样，它们的结构特征是Cu(Ⅱ)-SR距离很短。

9.1.c 细胞色素

最后一类要述及的电子转移蛋白是细胞色素(cytochrome)。和血红蛋白及细胞色素P-450一样，这些蛋白质也含铁卟啉作为氧化还原活性中心。所不同的是，血红蛋白和细胞色素P-450仅有一个来自蛋白质的配体和铁配位，留下一开放的配位位置以结合氧。然而，大多数细胞色素都有两个来自蛋白质的配体，足以形成配位饱和的八面体配合物。在真核生物细胞色素c中，轴向的配体一个是组氨酸的氮、一个是甲硫氨酸硫醚的硫，这些还将详细讨论。其他的细胞色素有2个组氨酸配体。

金枪鱼细胞色素c是这个家族中第一个测定结构的成员。该蛋白质示于图9.5中，其中含两条α-螺旋，伸出的链环绕着卟啉。和血红蛋白及细胞色素P-450不同，其中辅基所在的地方仅与轴向配体以非共价键力相互作用。细胞色素c中的卟啉通过2个硫醚共价结合，并由另外2个半胱氨酸根侧链和原卟啉Ⅸ的乙烯基相连。承受丙酸取代基的卟啉边缘则暴露在溶剂中。

现已测定了多种不同来源的细胞色素c的高分辨率晶体结构。比较氧化形的Fe(Ⅲ)和还原形的Fe(Ⅱ)的细胞色素的结构，表明伴随着氧化还原反应，结构的变化甚小。它的两种形式均为低自旋配合物，二者之间电子的不同为一t_{2g}型电子，这是一个非键电子，位于仅含σ成分的分子轨道上。上述结果证明了另一条规律，即大自然用以产生氧化还原反应的体系，在经历电子转移的过程中，结构的重排极小。多种细胞色素c曾广泛地用以研究氧化还原对在相隔已知距离上的电子转移反应。此处讨论的这些研究，和所有电子转移蛋白的生物功能都有关。

图 9.5　金枪鱼细胞色素 *c*

图中示出了铁卟啉基团和蛋白质残基的配位情况

9.2　远程电子转移

和许多双分子一样，电子载体必须满足在相反方向上作用时的两种制约。首先，它们必须适度的快，这种约束是基于这样一个事实，即电子穿越路径的迁移速率必须符合生物学的需要；其次，反应必须是专一的。电子转移的路径和其他的生物过程，如质子的移位相偶合。欲在路径的一端产生等当量的还原物，电子需要经过一系列的分子连续转移。倘若这些反应不是专一的，则电子从还原性最强的一个到最容易被还原的分子的转移，就会因中间插入的步骤和它们的偶合过程而短路。因此，电子转移通常发生在专一的蛋白质-蛋白质配合物间。这些配合物必须足够的稳定，才能使同族伙伴的识别成为可能；若不很稳定，配合物的寿命又很长，则会显著地限制全程的电子流动。由于这些过程内在的结构约束，生物学上的电子转移反应常须发生在给体和受体间相对远的距离(>10Å)上。

远程电子转移过程已通过多种途径进行过探测。首先进行的研究包括电子转移蛋白的自交换速率。这种探索的优点在于，对于自交换反应而言，驱动力恒等于零，因而去除了电子转移速率对该量的任何依赖。快的自交换速率可以通过氧化和还原形蛋白混合体系的 NMR 线宽效应来测定。铜绿假单胞菌蓝蛋白的自交换反应很快，速率常数为 $1.3\times10^{6}(\mathrm{mol/L})^{-1}\cdot\mathrm{s}^{-1}$。自交换过程对铜部位附近蛋白质表面的结构十分敏感。若在疏水性的小块区域里，用带正电荷的赖氨酸残基取代甲硫氨酸残基，则由于定点突变，导致自交换速率急剧降低到小于 $1\times10^{3}(\mathrm{mol/L})^{-1}\cdot\mathrm{s}^{-1}$。因此，当观测到快的自交换过程，则清晰地表明质子操纵了电子转移反应，慢

的自交换反应可能反映了蛋白质的自聚集模式并非由氧化还原中心本身的性质所决定。

第二种方法是制备人工合成的给体-受体对。血红素蛋白，例如细胞色素 c 就曾极广泛地用这种方法研究过。第一个实例是将$[Ru(NH_3)_6]^{3+}$基团和马心脏细胞色素 c 表面的组氨酸-33相连结(图 9.6)。氧化还原中心间的距离约为 12 Å。

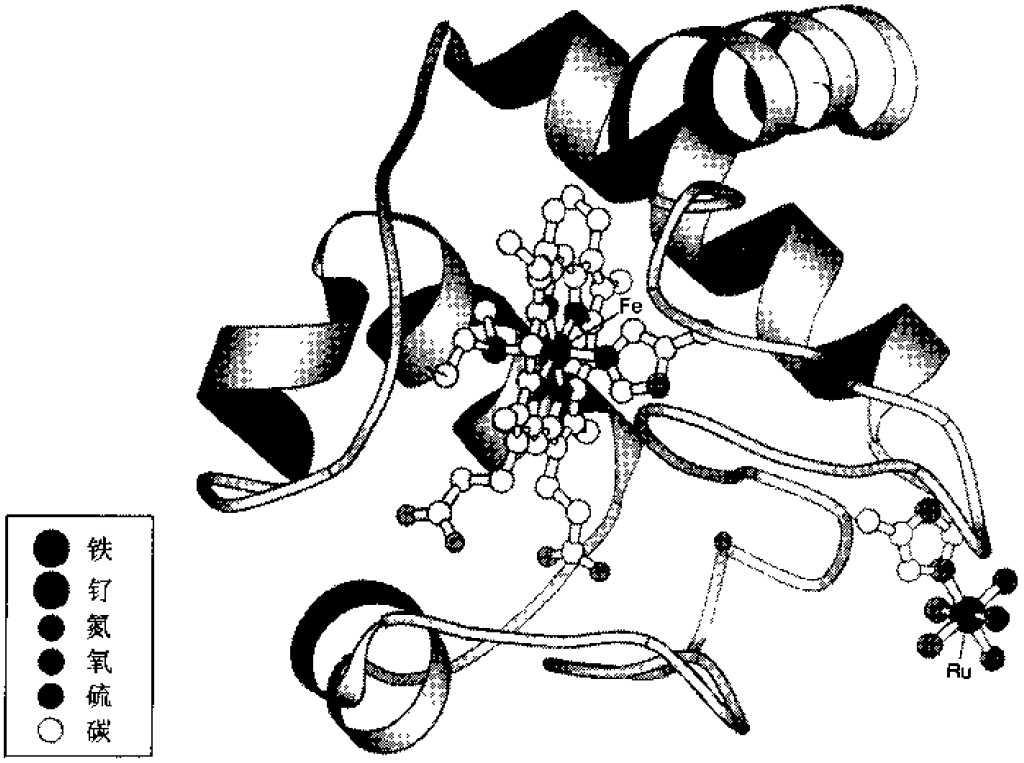


图 9.6 $[Ru(NH_3)_5]^{3-}$部分和马心脏细胞色素 c 表面 His 33 结合的结构图

该体系通过式 9.1 所示的路线进行研究：

$$\text{Cyt } c(\text{Fe}(\text{Ⅱ}))\text{-Ru}(\text{Ⅱ}) \xrightleftharpoons{\text{快}} \text{Cyt } c(\text{Fe}(\text{Ⅲ}))\ \text{Ru}(\text{Ⅱ}) \xrightarrow[e^-\text{转移}]{\text{分子内}} \text{Cyt } c(\text{Fe}(\text{Ⅱ}))\text{-Ru}(\text{Ⅲ}) \qquad (9.1)$$

结合在表面的钌配合物起始快的还原反应，通过光化学或脉冲辐射的手段来完成。分子内的电子转移，假设在已知的远程上发生，然后监测 Fe(Ⅱ)中心被还原成钌配合物的还原反应。对于上述著称的体系，分子内电子转移的速率约为 30 s^{-1}，而且基本上不依赖于温度。此结果证实了这类远程电子转移过程确实发生了。此外，对其他体系的研究，使得对距离、驱动力和介质的性质等诸多因素的研究也多少更系统些。一个关键的问题是：这类电子转移的发生是否通过化学键，在蛋白质内的行为是否像一个大的桥式配体，是通过空间、还是通过这两种类型组合的路径。

另一种方法是研究真实的蛋白质-氧还对。酵母细胞色素 c/细胞色素 c 过氧化物酶对就是一个曾被研究过的体系。当细胞色素 c 过氧化物酶中的铁卟啉被相应的锌卟啉取代所产生的物种，能被光致激发到三重态，它具有在远程还原其他物种的能力。光触发体系的存在，使电子转移这一步能通过它自身进行研究，如式 9.2 所示：

$$[\text{ZnP},\text{Fe}^{\text{Ⅲ}}\text{P}] \xrightarrow{h\nu} [^3\text{ZnP},\text{Fe}^{\text{Ⅲ}}\text{P}] \longrightarrow [\text{ZnP}^{\cdot+},\text{Fe}^{\text{Ⅱ}}\text{P}] \longrightarrow [\text{ZnP},\text{Fe}^{\text{Ⅲ}}\text{P}] \qquad (9.2)$$

此处，光产生细胞色素 c 过氧化物酶中锌卟啉的三重激发态。上述物种是一个强还原剂，它能

转移一个电子到细胞色素 c 的高铁卟啉上。然后，在锌卟啉基阳离子和细胞色素 c 的亚铁卟啉间发生热电子转移又回到始态。这最后的一步相当于生理反应，即还原形的细胞色素 c 被氧化形的细胞色素 c 过氧化物酶氧化(见 11.4.b 节)。酵母细胞色素 c/细胞色素 c 过氧化物酶对，在估计约为 17 Å 的距离上的电子转移速率接近 $1.1\times10^{4}\ s^{-1}$。若酵母细胞色素 c 被马心脏的细胞色素 c 所取代，则速率降至 $12\ s^{-1}$，这再次证明蛋白质-蛋白质的识别在促进分子间电子转移中的重要性。

该领域最近有一个激动人心的进展，那就是测定了从酵母中提取的酵母细胞色素 c 过氧化物酶和从马的心脏而来的细胞色素 c 分子形成的配合物的晶体结构。对酵母细胞色素 c，在形成的配合物中，Fe-Fe 距离为 26.5 Å，并和一条短的展开的多肽链(细胞色素 c 过氧化物酶残基 191～194)间存在 van der Waals 作用力。这条短的多肽链接近血红素基团和酵母细胞色素 c 的一部分，包括一个血红素的甲基基团。而在马心脏细胞色素 c 的结构中，Fe-Fe 距离较前者长 3.5 Å，但没有涉及到有关电子转移的途径。蛋白质-蛋白质配合物在生物电子转移中详细的结构信息，将十分有助于测定远程电子转移机理的实验设计。

另一个广泛研究过的体系是来自细菌的光合成反应中心。该中心的功能好似一个天然的光致电子输运体系。其主要的优点是它以蛋白质紧密结合的聚集体的形式存在，使晶体结构的测定有足够高的分辨率。这种结构信息赋予电子给体和受体的某些特性，如距离和相对方位以可靠性。该配合物中某些辅基间的电子转移速率已经测定。令人感兴趣的是，光合成反应中心和两个可能的电子转移网络近似地呈二重对称，但实际用到的只有其中的一个。此外，该体系实施单向电子转移的效率相当高。下一节我们还将回到这个体系上来。

9.3 电子转移与距离及驱动力的相关性

电子转移理论可预示氧化形和还原形蛋白质不同结构间、给体和受体间的距离及电子转移反应的驱动力对电子转移速率的相关性。这些理论的基础是给予和接受电子波函数的简单量子力学表达式。介质对这两个波函数所起的作用很小。电子转移反应的速率由式 9.3 决定：

$$k_{et}=(4\pi^{2}/h)T_{DA}^{2}(FC) \tag{9.3}$$

式中 T_{DA} 是隧道效应矩阵元，用以衡量还原物(给体，D)和氧化物(受体，A)间电子的偶合作用；FC 为 Franck-Condon 因子，用以量度在电子转移过程中核的移动。式中的每一项都能采取不同的近似方式。T_{DA}^{2} 最简单的表达式表示出和距离呈指数的衰减，正如式 9.4 所描述的那样：

$$T_{DA}^{2}=T_{DA}^{0\,2}\exp[-\beta(R-R_{0})] \tag{9.4}$$

式中 T_{DA}^{0} 为 $R=R_{0}$ 时的隧道效应矩阵元，R 为给体和受体最近的原子间的距离，R_{0} 为 van der Waals 接触距离(一般为 3.6 Å)，β 为描述介质效应的参数。上式为较复杂的表达式，其中包含了介质结构的因素。对这些表达式将作简短的讨论，FC 项最简单的形式构成了 Marcus 理论的基础。式 9.5 给出了经典的表达式：

$$FC=(4\pi\lambda kT)^{-1/2}\exp[-(-\Delta G^{0}-\lambda)^{2}/4\lambda kT] \tag{9.5}$$

式中 λ 称做重组能，k 为 Boltzmann 常数，T 为绝对温度，ΔG^{0} 为反应的标准自由能。该表达式能得出若干结论。也许最耐人寻味的是：和最初的直觉相反，电子转移速率在某种驱动力时达到一最大值；而当驱动力继续增加时，速率反而降低。

电子转移速率和距离的相关性，曾通过搜集许多体系最佳的速率数据加以研究。在有些体

系中，如光合成反应中心，距离已从 X 射线晶体学数据中得知。其他体系，如钌改性的细胞色素 c，距离则通过分子模拟法估计。由这些研究中得到的部分数据示于图 9.7 中。由图可见，速率的对数随距离的增加接近线性下降，正如式 9.3 和 9.4 所预示的那样，尽管某些速率和计算值在数值上差一或两个数量级。由直线的斜率测定的乘幂 β 为 1.4(Å)$^{-1}$，相当于距离每增加 1.7 Å，速率降低 10 倍。这个数值应与电子通过真空转移所预期的 2.8(Å)$^{-1}$，和通过以共价键相连的体系时，对电子转移速率的研究所得到的 0.7(Å)$^{-1}$相对照。在 van der Waals 接触的距离上，最大的速率接近 $10^{13}s^{-1}$。

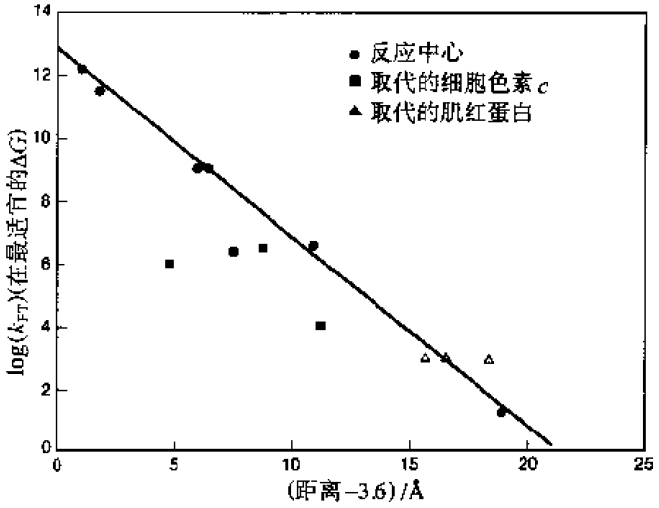


图 9.7　某些天然的和钌改性蛋白的电子转移速率常数对距离的图

速率常数的对数对距离在很大的速率和距离范围内近似地呈线性关系，尽管存在某些明显的偏离 [引自 C. C. Moser et al., *Nature* 355, 796～802(1992)]

根据蛋白质的数据所得到的 β 的中间值，提出电子转移的途径是通过键和通过空间这两种步骤的结合。已经建立起的一个模型显然是综合了这些效应，其中包括三种类型的步骤，即通过共价键、通过氢键和通过空间。通过后两种转移型式的距离，包括在参数中。该方法在实施时，借助计算机程序的帮助，考虑了从给体到受体间所有可能的途径，并计算预期的总速率。该方法有两个具有吸引力的特征。首先，如前所述，它为蛋白质提供了一个合理的 β 中间值。其次，对某些体系，它有可能从简单的指数的距离相关性计算其偏离。蛋白质内某些部位对，能通过十分有效的途径偶合，其中包括大多数的共价键和少数通过空间的短距离跳跃，而其他的一些则不然，尽管它们相距在类似的距离上，但预期有效的偶合却差得多。该模型的细节可供设计实验用。其中由简单的距离相关性预示的电子转移速率和由路径模型预示的在性质上截然不同。一系列钌改性的细胞色素 c 衍生物的实验速率和由路径模型预示的以及基于简单的距离相关性预示的速率的比较，示于图 9.8 中。注意，在许多情况下，路径模型所预示的速率和那些从简单的距离相关性所预示的类似。上述结果的产生，并不是因为电子转移速率与路径的性质无关，而是因为蛋白质的结构通常所提供的路径，实际上类似于通过键和通过空间这两种步骤的混合形式。

由式 9.5 预示的驱动力相关性也曾通过实验探测(图 9.9)。例如，钌改性的细胞色素 c 衍生物，包括那些用锌取代铁，以产生一寿命相对长的光激发态，并在驱动力跨度为 0.4 eV，约相当于 41.8 kJ/mol(10 kcal/mol)的范围内测定了速率。将该速率数值代入式 9.5，得到的重

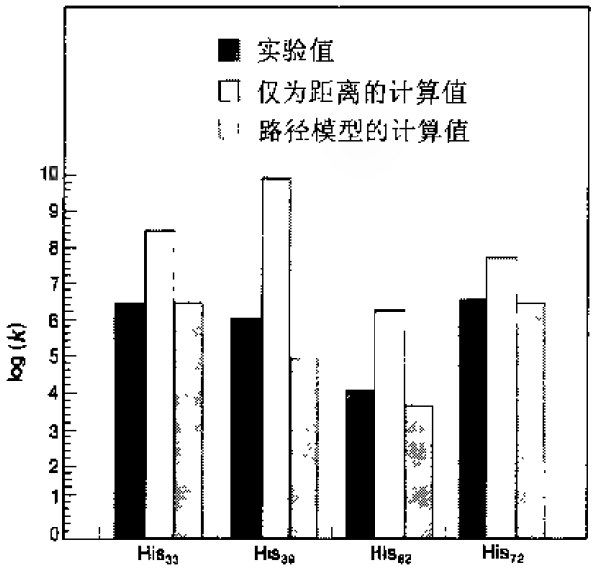


图 9.8　一系列五氨合钌改性的细胞色素 *c* 衍生物电子转移的实验速率常数及计算速率常数的比较

其中计算速率数仅基于距离和路径模型(路径模型显然包括可能的电子转移路径)

[引自 D. S. Wuttke et al., *Science* 256, 1007～1009(1992)]

组能 λ 的数值为 1.1～1.2 eV,相当于使起始配合物畸变到产物的几何构型而不发生电子转移。上述参数概括了几个组分,包括给体和受体配合物本身几何构型间的差异,蛋白质的重新组合,例如,肽偶极的重新定向,溶剂的重组。正如本章前面指出的,第一项对天然基团的电子转移似乎很小。对钌改性的细胞色素 *c*,第一项估计为0.2 eV。蛋白质和溶剂项估计分别为 0.2 eV和0.6 eV。因而 λ 的总值约为 1.0 eV,和实验值符合得较好。

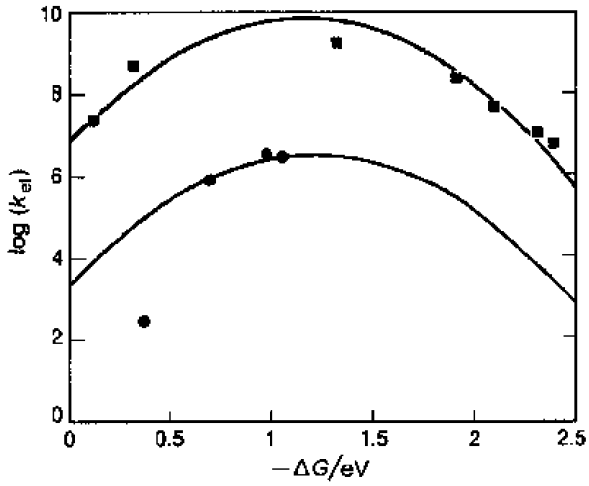


图 9.9　电子转移反应中驱动力效应对速率常数的曲线

该曲线证明了倒置的 Marcus 区域。数据表示了一系列钌改性的细胞色素 *c* 衍生物(下)和一系列共价结合的有机给体/受体化合物(上)[引自 T. J. Meade et al., *Journal of the American Chemical Society* 111, 4353～4356(1989)和 G. L. Closs & J. R. Miller, *Science* 240, 440～447(1988)]

如上所述，表征得最好的电子转移体系之一是光合成反应中心。该蛋白配合物输运电子经过一响应光吸收的膜。光最初被“特殊对”，即一组两个在空间相距甚近的细菌叶绿素所吸收，细菌叶绿素为与 Mg(Ⅱ)结合的还原型卟啉。该反应中心同时含另外两个细菌叶绿素，两个细

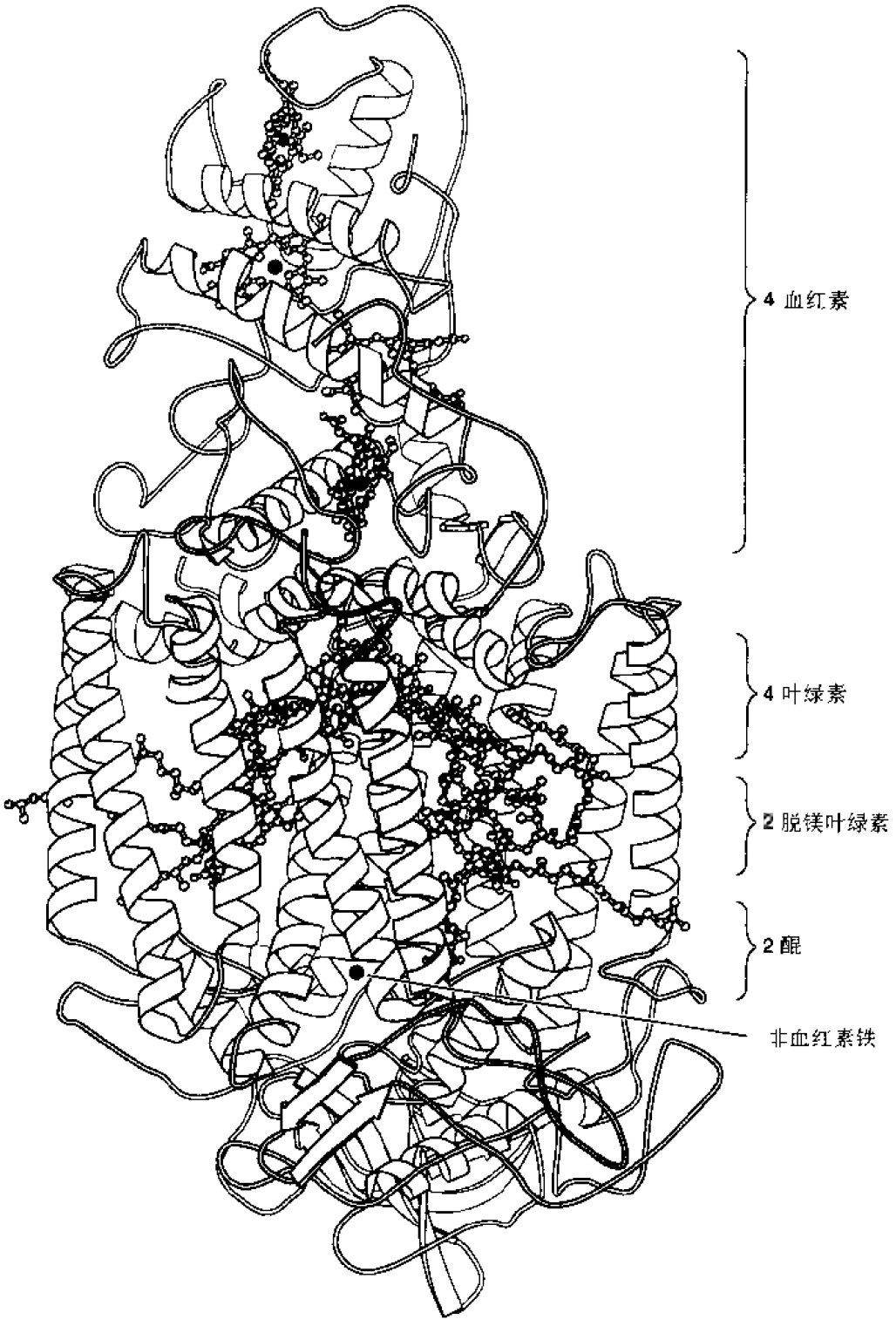


图 9.10　绿色红假单胞菌光合作用中心

图中示出了总体结构和辅基位置

菌脱镁叶绿素[不含 Mg(Ⅱ)的细菌叶绿素],一个不具备任何氧还功能的非血红素铁,和 1 个或 2 个结合的醌。这些辅基排布在两个十分相似的网络中,从膜的一侧延伸到另一侧。该结构图示于图 9.10 中(参见图 12.11)。快的动力学研究表明,最初的电子转移发生在小于 5 ps 的时间内。上述研究和其他的观测指出,这一步和驱动力及重组能很好地匹配,是最优的。正反应的驱动力包括吸收光子的能量。转化区域的存在,对防止电子转移从还原形的细菌脱镁叶绿素到氧化形特殊对的逆反应很重要。反应的驱动力很大,明显地高于重组能,从而降低了速率,使沿着路径越过膜的转移能完全成功。因此,转化区域不仅具有理论意义,而且在有可能使光合电荷分开的过程中起核心作用。

习　题

1. 运用定点突变,有可能用天冬氨酸取代蓝蛋白中和铜结合的半胱氨酸。你能否预示 Cu(Ⅱ)配合物的突变体和野生型蛋白质比较,在波谱性质上有何区别?
2. 电子转移速率曾用钌改性的肌红蛋白进行过研究。还原形的肌红蛋白为高自旋的五配位配合物,而氧化形的则结合一个水分子形成六配位的配合物。你能否预期从该中心到结合在表面的钌的电子转移速率类似于相应的细胞色素 c 衍生物,并给出同样的距离和驱动力?试加以解释。
3. 试估计电子转移发生在 30 Å 的距离上,并通过一由共价键相连的体系的最佳速率。重复进行计算,并假设通过蛋白质发生电子转移。
4. 光合作用中心结构的一个显著的特征是存在一电子转移路径的平行对,其中的一个未加利用。试给出数据,指出通过所用路径的速率至少比未用的那个快 100 倍,计算 Marcus 理论参数上的不同,假设这种不同的起因是:(a) 完全由于距离的不同;(b) 完全由于驱动力的不同;或(c) 完全由于重组能的不同。对于用到的路径,假设距离为 10 Å,驱动力为 0.2 eV,重组能为 0.2 eV。注意,室温下 $kT=0.026$ eV。
5. 设两个蛋白质中电子给体和受体在相距 20 Å 时的电子转移速率常数为 200 s^{-1}。试计算当距离增至 25 Å 时,上述这两个蛋白质的速率常数。假设介质参数 $\beta=1.4(Å)^{-1}$。

参 考 文 献

一般参考文献

H. Sigel, ed. 1991. *Electron Transfer Reactions in Metalloproteins. Metal Ions in Biological Systems*, Volume 27. Marcel Dekker, New York.

电子载体

E. T. Adman. 1991. "Copper Protein Structures," in C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, D. S. Eisenberg, and F. M. Richards, eds., *Advances in Protein Chemistry*, Volume 42. Academic Press, San Diego, 145–198.

H. Beinert. 1990. "Recent Developments in the Field of Iron-Sulfur Proteins." *FASEB J.* 4, 2483–2491.

S. K. Chapman. 1991. "Blue Copper Proteins," in R. W. Hay, J. R. Dilworth, and K. B. Nolan, eds., *Perspectives in Bioinorganic Chemistry*, Volume 1. JAI Press. London, 95–140.

W. Cramer and D. B. Knaff. 1991. *Energy Transduction in Biological Membranes* Springer-Verlag, New York.

J. B. Howard and D. C. Rees. 1991. "Perspectives on Non-Heme Iron Protein Chemistry," in C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, D. S. Eisenberg, and F. M. Richards, eds., *Advances in Protein Chemistry*, Volume 42. Academic Press, San Diego, 199–280.

W. L. Lovenberg, ed. 1973–1977. *Iron-Sulfur Proteins*, Volumes 1–3. Academic Press, New York.
G. R. Moore and G. W. Pettigrew. 1990. *Cytochromes C*. Springer-Verlag, New York.
E. I. Solomon and M. D. Lowery. 1993. "Electronic Structure Contributions to Function in Bioinorganic Chemistry." *Science* 259, 1575–1581.
A. G. Sykes. 1991. "Plastocyanin and the Blue Copper Proteins." *Struct. and Bond.* 75, 175–224.

远程电子转移

P. Betrand. 1991. "Applications of Electron Transfer Theories to Biological Systems." *Struct. and Bond.* 75, 1–48.
B E. Bowler, A. L. Raphael, and H. B. Gray. 1990. "Long-Range Electron Transfer in Donor(Spacer)Acceptor Molecules and Proteins." *Prog. Inorg. Chem.* 38, 259–322.
S. G. Boxer. 1990. "Mechanisms of Long-Distance Electron Transfer in Proteins: Lessons from Photosynthetic Reaction Centers." *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 19, 267–299.
G. H. Closs and J. R. Miller. 1988. "Intramolecular Long-Distance Electron Transfer in Organic Molecules." *Science* 240, 440–447.
B M. Hoffman and M. A. Ratner. 1987. "Gated Electron Transfer: When Are Observed Rates Controlled by Conformational Interconversion?" *J. Am. Chem. Soc.* 109, 6237–6243.
R. J. P. Williams. 1989. "Electron Transfer in Biology." *Molec. Phys.* 68, 1–23.

电子转移与距离及驱动力的相关性

D. Beratan, J. N. Onuchic, J. R. Winkler, and H. B. Gray. 1992. "Electron Tunneling Pathways in Proteins." *Science* 258, 1740–1741.
C. C. Moser, J. M. Keske, K. Warncke, R. S. Farid, and P. L. Dutton. 1992. "Nature of Biological Electron Transfer." *Nature* 355, 796–802.
J N. Onuchic, D. N. Beratan, J. R. Winkler, and H. B. Gray. 1992. "Pathway Analysis of Protein Electron-Transfer Reactions." *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21, 349–377.
H. Pelletier and J. Kraut. 1992. "Crystal Structure of a Complex Between Electron Transfer Partners, Cytochrome c Peroxidase and Cytochrome c." *Science* 258, 1748–1755.

第 10 章　底物结合与活化的非氧化还原机理

10.1　水解酶
10.2　裂解酶：碳酸酐酶
10.3　氧化还原酶：醇脱氢酶
10.4　核苷酸活化作用

在金属酶中，金属离子的正电荷是一个关键的特征，它能降低配位水分子的 pK_a 值，并提供局部高浓度的 OH^- 反应物，这在其他情况下是达不到的。在类似的意义上，带正电荷的金属中心也能作为一般的 Lewis 酸来活化底物分子，并在配位以后调节它的反应性能。通过对金属离子配位层的内部进攻或使底物的配体定位于活性部位，接近主要的基团，从而加快反应速率。蛋白质侧链极大地协助了活性配合物的聚集，以利于催化，并和金属中心通力合作。在整个过程中，静电相互作用具有基本的重要性。

本章将探索一类和金属离子结合并被活化的底物，但在催化机理的任何一步，它们本身均不发生氧化还原反应(表 1.3)。许多金属酶按这种方式起作用，但无论是它们的活性部位固有的组分，抑或是结合和活化底物的辅因子，都运用了非氧化还原性的金属离子，如 Mg(Ⅱ)和 Zn(Ⅱ)。尤其是 Zn(Ⅱ)离子，在生物学上的过渡金属离子中，它特别适宜于作为 Lewis 酸而不参与电子转移反应。首先认识到锌在生物化学过程中的特殊功能，是在 1939 年发现锌是碳酸酐酶的必不可少的组分。碳酸酐酶是一个裂解酶，催化的反应如式 10.1 所示：

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+ \qquad (10.1)$$

当没有酶存在时，反应速率很慢，在生理 pH 条件下仅为 $\sim 10^{-2}\ s^{-1}$，但当有酶存在时，竟提高到 $10^6\ s^{-1}$。1955 年发现了第二种含锌的金属酶，羧肽酶(CPD)A，它能使肽键按式 10.2 的方式裂解：

$$R-CO-NH-CHR'-CO_2^- + H_2O \rightleftharpoons R-CO_2^- - H_3N^+ - CHR'-CO_2^- \qquad (10.2)$$

式中 R′是蛋白质或肽 C-端芳香族的残基；在类似的蛋白质像羧肽酶 B 中，R′则为碱性基团。此二者均在胰腺中合成，并通常由胰腺中分离出来。锌起催化作用的其他水解酶有碱性磷酸酶，它促进的反应如式 10.3 所示，还有蛇毒磷酸二酯酶及多种核酸酶：

$$R-O-PO_3^{2-} + H_2O \rightleftharpoons ROH \cdot HPO_4^{2-} \qquad (10.3)$$

此外，锌还是转移酶的重要功能组分，如 DNA 和 RNA 的聚合酶和逆转录酶、同分异构酶和裂解酶，还包括某些氨酰基 tRNA 合成酶，尽管对其中的一些我们还很难辨别它们是起催化作用还是结构作用。显然，在生物学上的许多水解酶和基团转移酶中，锌(Ⅱ)都起着重要的作用，因而在生物无机化学中，它是被研究得最多的元素之一。本章要详细讨论的实例是三种锌酶：羧肽酶(carboxypeptidase)，一种水解酶；碳酸酐酶(carbonic anhydrase)，一种裂解酶；醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)，一种氧化还原酶。其中锌活化底物参与氧化-还原化学，并包含辅因子 NAD^+。

10.1 水解酶

我们从羧肽酶 A 和嗜热菌蛋白酶开始讨论。目前，对这两种重要的水解酶的结构和机理已有相当的了解。肽的水解是一个颇为困难的反应，尽管在水溶液中它是热力学上有利的。为了催化上述反应，作为酶必须完成几件事：首先，它必须促进亲核剂对肽羰基的亲核进攻。这个任务可由产生一高活性亲核剂或通过极化激活羰基进攻来完成；其次，它必须稳定由对羰基碳进行亲核进攻产生的四面体中间体或过渡态；最后，它必须稳定酰胺的氮原子，使之成为适宜的离去基团，致使四面体中间体能自 C—N 键间断裂。原则上，金属离子如锌，可在任何或所有这些过程中起作用。这些年来，许多研究都集中在推断肽酶的机理，以阐明活性部位锌离子的功能。

10.1.a 羧肽酶 A 和嗜热菌蛋白酶：结构研究

目前，已从小牛胰腺中提取到三种形式的羧肽酶 A，它们分别含 307、305 和 300 个氨基酸残基，依次以 A_α、A_β 和 A_γ 表示。后两种在 N-端稍短。羧肽酶 A_α 的结构已由高分辨 X 射线晶体结构测定，并成为许多酶机理研究的基础。图 10.1 描绘了该蛋白质的结构及放大的活性部

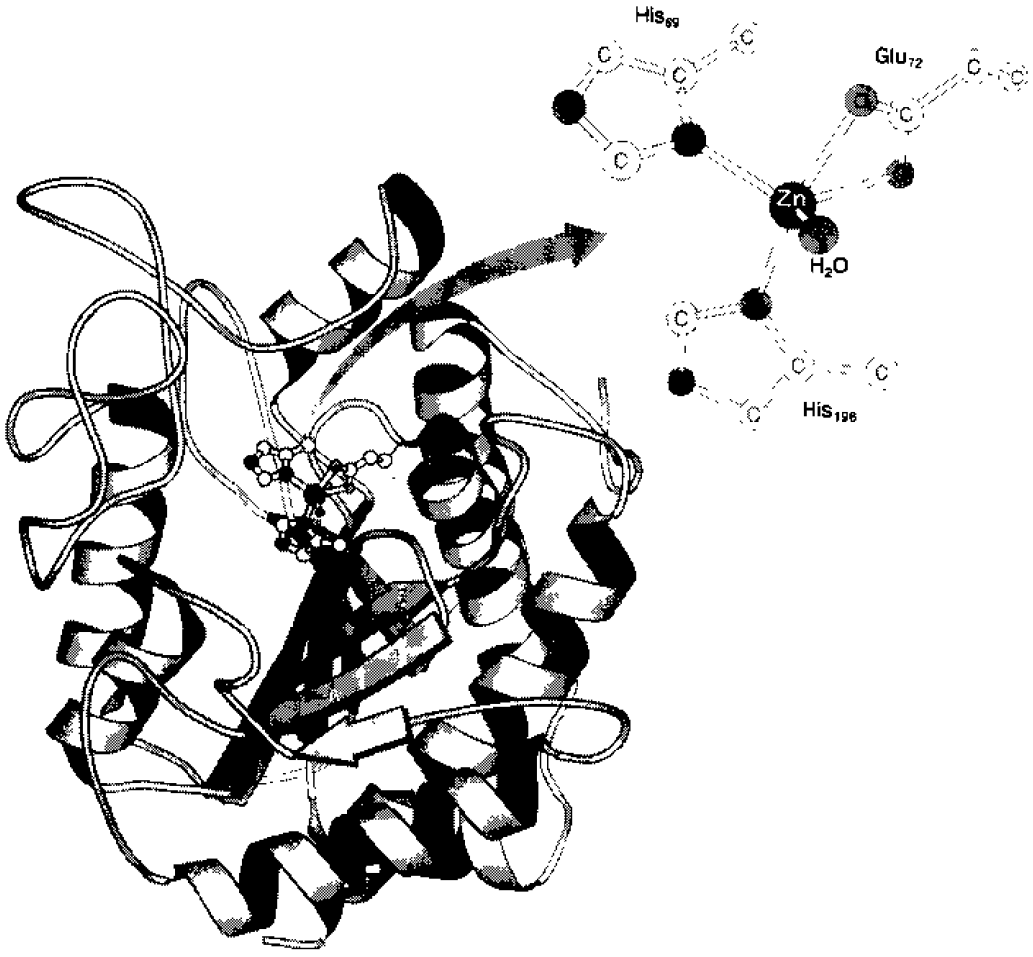


图 10.1 从小牛胰腺中提取和羧肽酶 A 的结构和锌基活性部位

位。锌原子位于蛋白质表面的内侧，并和两个来自组氨酸-69和组氨酸-196的咪唑侧链及谷氨酸-72的羧基双齿配位。此外，再结合一个水分子，构成Zn(Ⅱ)五配位的配位几何构型。当有底物或抑制剂存在时，谷氨酸-72的羧基转变成更接近单齿配位的形式。由于谷氨酸或天冬氨酸残基能按某种方式重排，致使羧基位移的过程发生，并使配位数保持恒定或接近恒定，即使有各种不同形式的底物围绕在金属周围。在活性部位附近有一疏水性的口袋，底物分子C-端的芳香环恰好伸入其中。在配位水分子和谷氨酸-270间存在着氢键。若干精氨酸和酪氨酸残基位于活性部位，在这种情况下，它们能参与底物的结合和活化。

羧肽酶A和数种底物及抑制剂配合物的高分辨X射线结构研究，包括甘氨酸-酪氨酸，(—)-2-苯甲基-3-对-甲氧基苯甲酰基丙酸(一种酯的类似物)和来自马铃薯的39-氨基酸抑制剂已有报道。在低温(—9℃)和分辨率为1.6Å条件下对甘氨酰-L-酪氨酸加合物的研究，阐明了若干重要的特征(图10.2)。如上所述，酪氨酸的环取代了水分子，并位于疏水性的口袋中。甘氨酸残基用它的酰氨羰基氧原子及端梢氨基氮原子和锌双齿螯合。后者取代了通常和锌配位的水分子，致使酶-底物配合物无法进行肽水解，否则晶体中的甘氨酸-酪氨酸配合物，在收集X射线数据所需要的时间内便会发生水解。这些结果间接地证明了在酶机理中，活化和锌离子配位的水分子是一个关键的特征。精氨酸-145与端梢的$R\text{-}CO_2$-残基以氢键相连。谷氨酸-270的γ-羧基和肽酰胺氮原子正处在氢键距离内。最后，精氨酸-127位于活性部位，在谷氨酸-270相对的一侧。

嗜热菌蛋白酶(thermolysin)肽链内切酶的结构已测定到高分辨精度。该酶的总体结构示于图10.3中，它和羧肽酶没有多少相似处。然而，仔细审视活性部位则发现有若干惊人的相似性。在未连接的形式中，锌离子和3个侧链相配位，它们是组氨酸-142、组氨酸-146和谷氨酸-166，此外，还有1个水分子。未配位的氨基酸侧链在这两种蛋白质中也相似。谷氨酸-143所在的位置和羧肽酶中谷氨酸-270的相似，而组氨酸-231和精氨酸-127匹配。这些相似性以及相应机理性的结论，揭示这一对酶构成趋同进化的实例，凭一个几乎等同的结构和化学解释，引申出促进两个极其相关的反应的催化作用，而与它们的蛋白质骨架却全然无关。

10.1.b 羧肽酶A：金属取代和波谱

在生物无机化学中，羧肽酶代表了应用金属的取代作用进行探测的典型。由于Zn(Ⅱ)在磁性和波谱性质上缺乏变化，因而对多种金属取代衍生物进行了广泛的研究。尤其是Co(Ⅱ)的衍生物，它能从脱辅基蛋白来制备，且活性较水解肽的天然酶高，几乎和酯的水解一样有效。含Mn(Ⅱ)和Cd(Ⅱ)的衍生物则活性较低，Ni(Ⅱ)、Hg(Ⅱ)和Pb(Ⅱ)仅有少许活性，而Cu(Ⅱ)和Co(Ⅱ)的酶，像脱辅蛋白一样，完全没有活性。Co(Ⅱ)-CPD的光吸收、MCD和EPR谱和四配位或五配位的二价钴配合物类似，峰值为$\lambda_{max}\approx 550$和527 nm [$\varepsilon\approx 150(mol/L)^{-1}\cdot cm^{-1}$，500 nm处有一肩峰]以及940 nm和1570 nm。g值为5.53、2.94和2.01。这些波谱特征对Co(Ⅱ)来讲并不寻常。然而，它们已用于张力态假设的公式化(见第12章)。当加入阴离子(Cl^-、Br^-、F^-、SO_4^{2-}、NO_2^-)时，它们并不发生变化，即使加入大量的甘氨酸-酪氨酸也不发生变化。主要的改变发生在当谷氨酸-270被碳化二亚胺试剂修饰时。事后，得益于X射线晶体学才认识到，其波谱可根据图10.1所示的五配位结构畸变的程度来判断。虽然这些研究并未对机理产生明确的结论，然而，它们确实提供了许多推测，这是任何机理的假设都必须满足的。

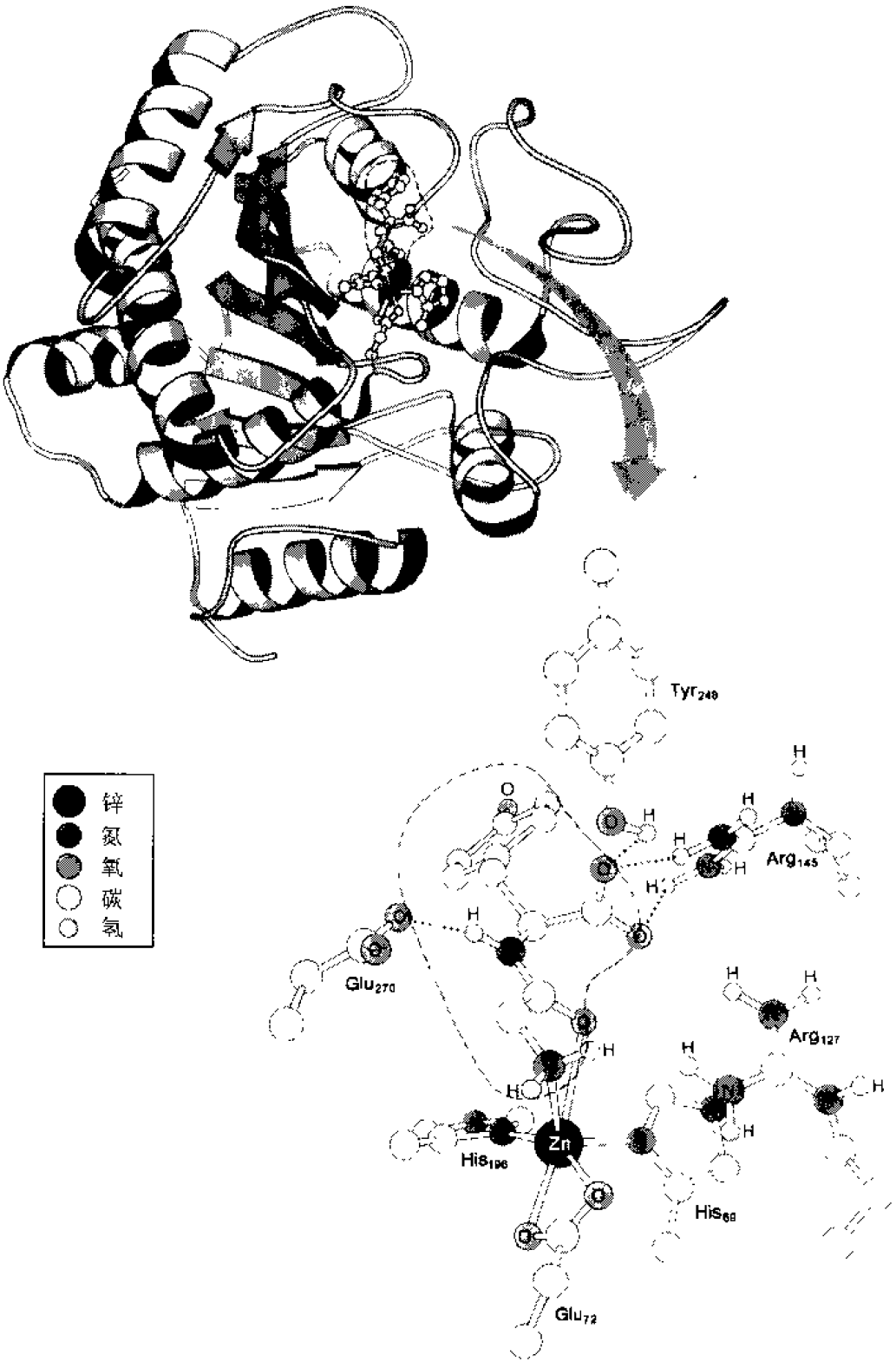


图 10.2　羧肽酶 A 和抑制剂甘氨酰-L-酪氨酸(虚线框内)在活性部位的键合
与关键的活性部位残基相连的氢键用点线表示

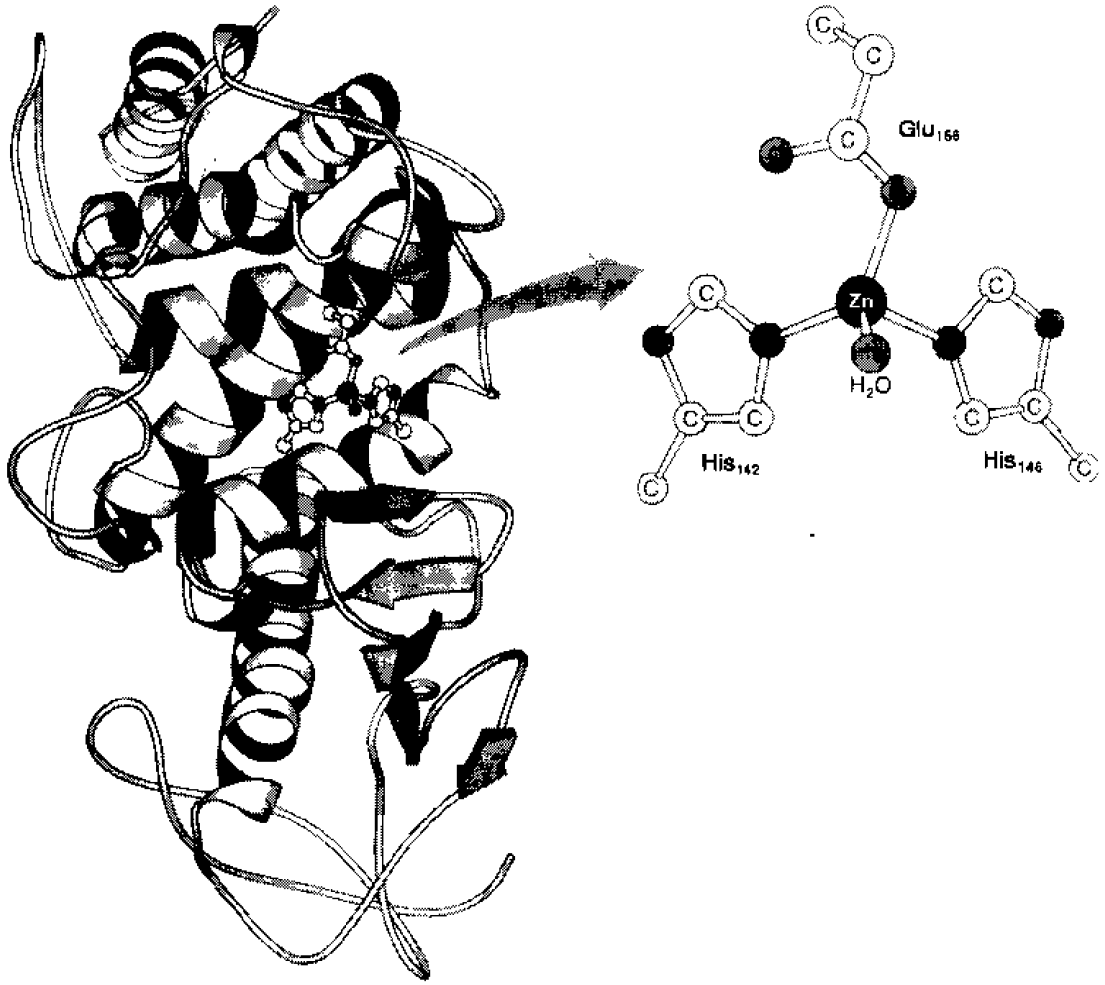


图 10.3　嗜热菌蛋白酶及其活性部位的结构

10.1.c　动力学研究和酶机理假设

羧肽酶 A 按照 Michaelis-Menten 动力学水解三肽和四肽，其 $k_{催化}\approx 20\sim 500\ s^{-1}$，$K_M$ 约为 0.01～1 mmol/L，依赖于底物。此处 $k_{催化}=V_{max}/E_0$，称为循环数，V_{max} 由 3.1.f 节定义，E_0 则为总的酶浓度。$k_{催化}/K_M$ 的剖面呈钟形(图 10.4)，表观 pK_a 值为 6.1 及 9.0。

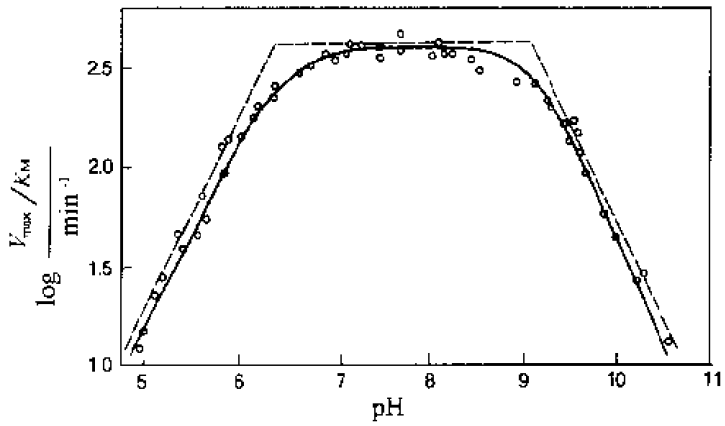
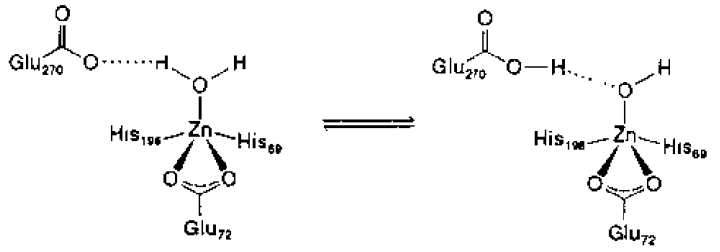


图 10.4　羧肽酶 A 水解一组四个底物时，$\log(V_{max}/K_M)$ 对 pH 的依赖关系

在 pH 低时，速率的降低归结为与锌键合的氢氧根的质子化

[引自 D. S. Auld & B. L. Vallee, *Biochemistry* 9, 4352～4359(1970)]

前一个数值无疑由和金属键合的水分子而来(图 10.1),因为在 Co(Ⅱ)酶中,它移至 5.3。一个由电离导致的貌似合理的反应示于式 10.4 中:



(10.4)

谷氨酸-270 的羧基和与金属键合的水分子能形成氢键,可导致 pK_a 值比通常的≈10 有所降低(见表 2.2)。

根据上述动力学报道和 X 射线结构测定的结果,提出了羧肽酶 A 和它的抑制剂配合物如下的详细酶机理描述(图 10.5)。多肽链末端的氨基酸残基结合在活性部位上,通过端梢的羧基和精氨酸-145 的相互作用定向。此外,与天冬酰胺-144 和酪氨酸-248 间也能形成氢键,从而增强了稳定性。若端梢的基团为芳香基,则定位于疏水性的口袋中。易断裂的肽键的羰基,即要水解的那一个,与精氨酸-127 作用,增加了它的 Lewis 酸酸性。下一步则是配位水分子进攻肽的羰基,随之转移一个质子给谷氨酸-270。酶机理中关键的一步是,由于和 Zn(Ⅱ)配合的水分子的脱质子及适当定位的谷氨酸-270 的碱性,增加了水分子的亲核性。这种亲核进攻产生了四面体的中间体。该抑制剂配合物的晶体学研究强烈地提出:上述中间体和锌以双齿的形式键合。

例如,考虑 N-(叔-丁氧基羰基)-5-氨基-2-苄基-4-氧-6-苯基己酸,如图 10.6 所示,这是一个底物的类似物,其中的酰胺基 NH 被 CH_2 取代。该简单酮的羰基在水溶液中仅水解了 0.2% 以下。然而,上述化合物与羧肽酶的配合物,经晶体学研究表明它彻底水解了,如同偕二醇(或醇盐)那样双齿键合。这个结果表明,或者是酶从溶液中选择了低浓度已水解的酮,或者是酶和未水解的底物结合,并实施酰胺水解机理的第一步,将氢氧根离子加到羰基上。该反应不能进行,因无适宜的离去基团。对于常规的底物,断裂四面体中间体需要酰胺氮的加质子作用。最初,从 X 射线结构分析,似乎酪氨酸-248 可携带一个质子到离去基团上。定点突变的研究表明,用苯丙氨酸取代酪氨酸-248,酶的活性仅有微小的变化。一个有吸引力的替换物是谷氨酸-270,它现在是质子化的,从与锌键合的水分子那里夺取了一个质子。该假设为与嗜热菌蛋白酶的比较所证实,其中谷氨酸-143 定位于起上述作用,而那里没有其他质子给体可供选择。C—N键断裂的结果,产生了游离的羧基端氨基酸,并由于端梢的羧基和锌键合而使肽链变短。由水分子取代或补充底物以完成循环。上述机理概括在图 10.5 中。

上述机理阐明了金属离子如何促进水解反应的诸多方面。锌(Ⅱ)离子的作用好似一块模板,它聚集了在断裂肽键时的活性基团,特别是起关键作用的谷氨酸-270 的羧基官能团。金属离子的 Lewis 酸性和谷氨酸-270 羧基的碱性,降低了键合水分子的 pK_a 值,后者进攻易断裂的肽键。必须强调,在肽的水解中,锌离子虽然起了关键的作用,但多肽链周围的氨基酸残基同样非常重要。谷氨酸-270 和精氨酸-127 在肽键断裂中起了关键的作用。就这样,大自然聚集了有效的化学体系以促进肽键的催化水解,一个基本的新陈代谢反应,速率远比在中性 pH 条件下未催化的水解反应快。

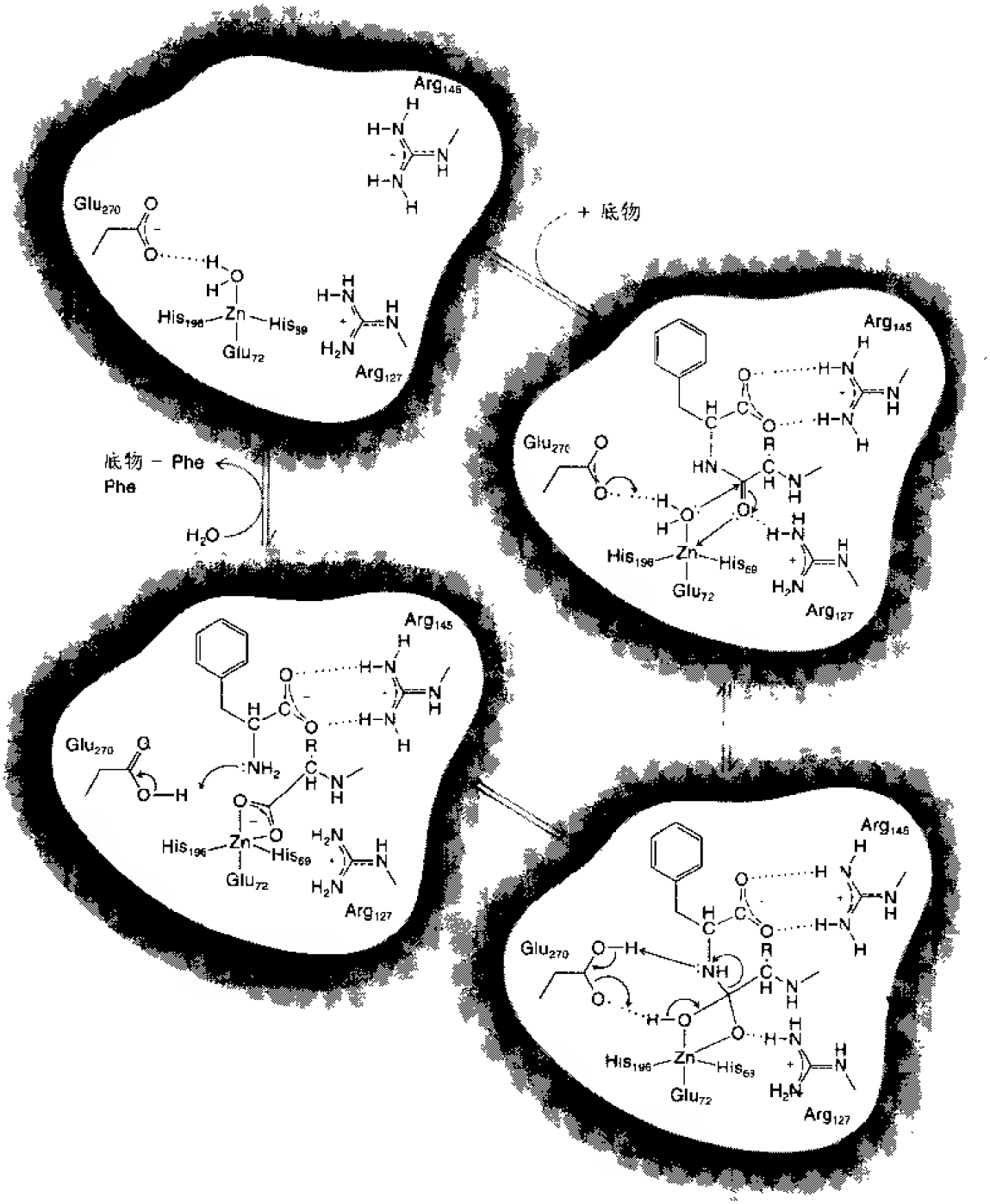


图 10.5　肽键被羧肽酶 A 水解的机理

包括羧酸根协助产生与锌键合的氢氧根离子，后者进攻肽的羰基

10.1.d　碱性磷酸酶

多种锌水解酶已被表征，其中的一个酶，即碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)，有一对锌(Ⅱ)离子和底物端梢的磷酸酯基团结合，典型的为单酯，如对-磷酸硝基苯酯。丝氨酸的氢氧根处于活性部位，进攻磷酰基，是断裂酯的官能团。在这一过程中，磷酸酯转移到酶上，形成磷酰基丝氨酸残基。该磷酸酯被配位的氢氧根离子水解，完成催化循环。

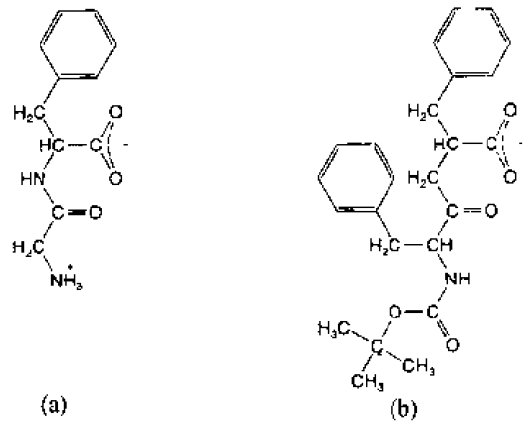


图 10.6　羧肽酸 A 的两个抑制剂的结构

(a) 甘氨酸-酪氨酸;(b) N-(叔-丁氧基羰基)-5-氨基-2 苄基-4-氧-6-苯基己酸

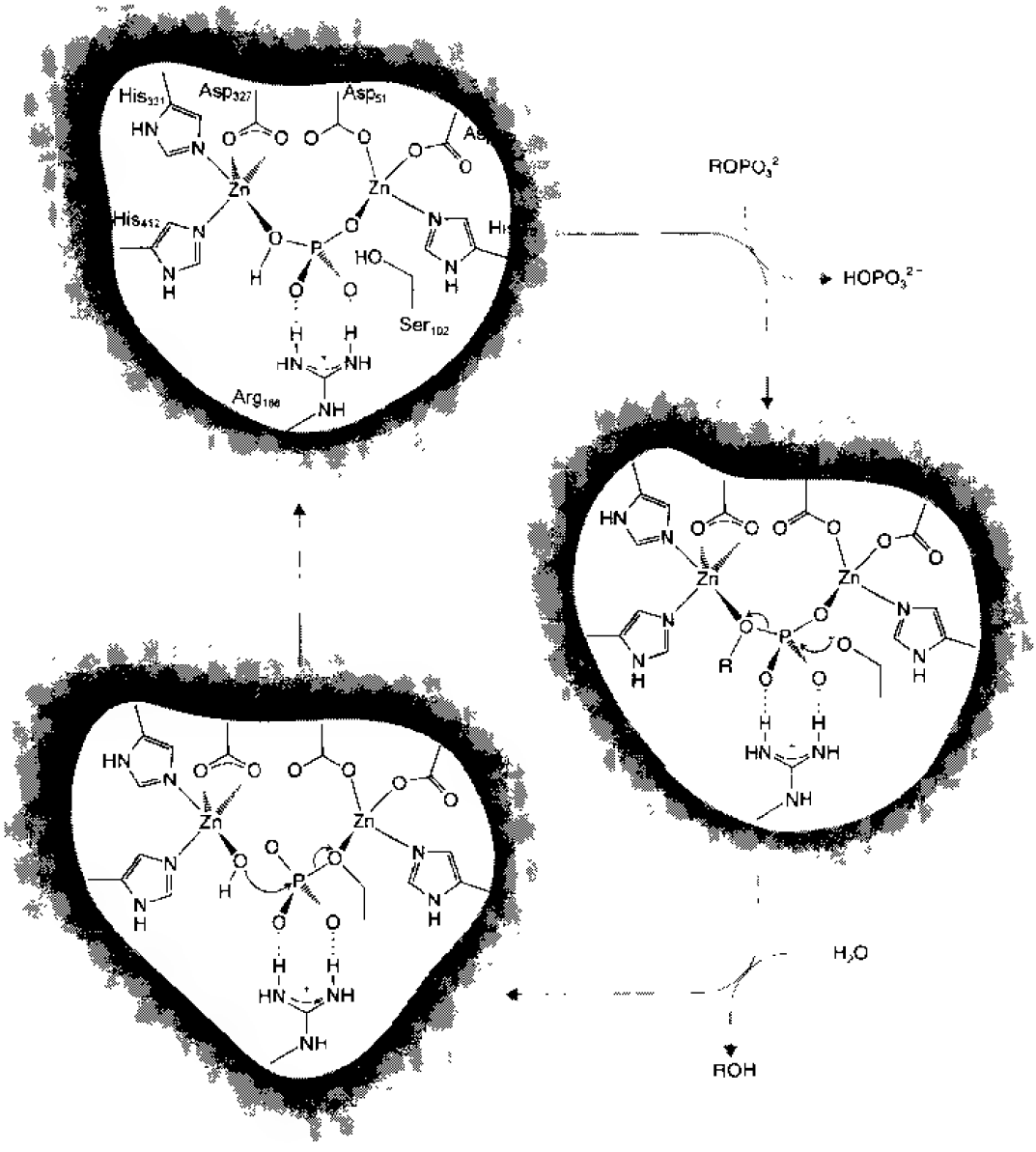


图 10.7　磷酸单酯被碱性磷酸酶水解

上述步骤在图10.7中详细示出。在碱性磷酸酶中，这一对锌离子的作用像通常的 Lewis 酸一样，极化底物赋予它更好的亲电性。精氨酸残基将磷酸酯定位于活性部位，类似于在羧肽酶中，精氨酸-145 能使底物端梢的羧基定向。最后，和锌键合的氢氧根断裂磷酰基丝氨酸酯，恰似图 10.5 中的步骤。有意思的是，在碱性磷酸酶中，还有第三个金属，它是一个镁离子，距一个锌≈5Å以内，而距另一个锌7Å。虽然该金属离子似乎没有直接参与催化机理，但它可能对结构的定形和活性部位的静电电位起作用(见第 12 章)。

10.2 裂解酶：碳酸酐酶

前已指出，碳酸酐酶是第一个被发现含锌的生物分子。和羧肽酶一样，该酶也通过多种实验手段进行过广泛的研究，一致的看法是目前已深入到机理和锌离子的作用上。若干不同的同功酶已用晶体学的方法表征，其中一个的总体结构示于图 10.8 中。锌(Ⅱ)离子被 3 个组氨酸的咪唑侧链配位，它们是组氨酸-94、组氨酸-96(通过它们的 N_ϵ 原子)和组氨酸-119(通过 N_δ)。此外，还有一个水或氢氧根和金属键合，完成畸变四面体的配位层。

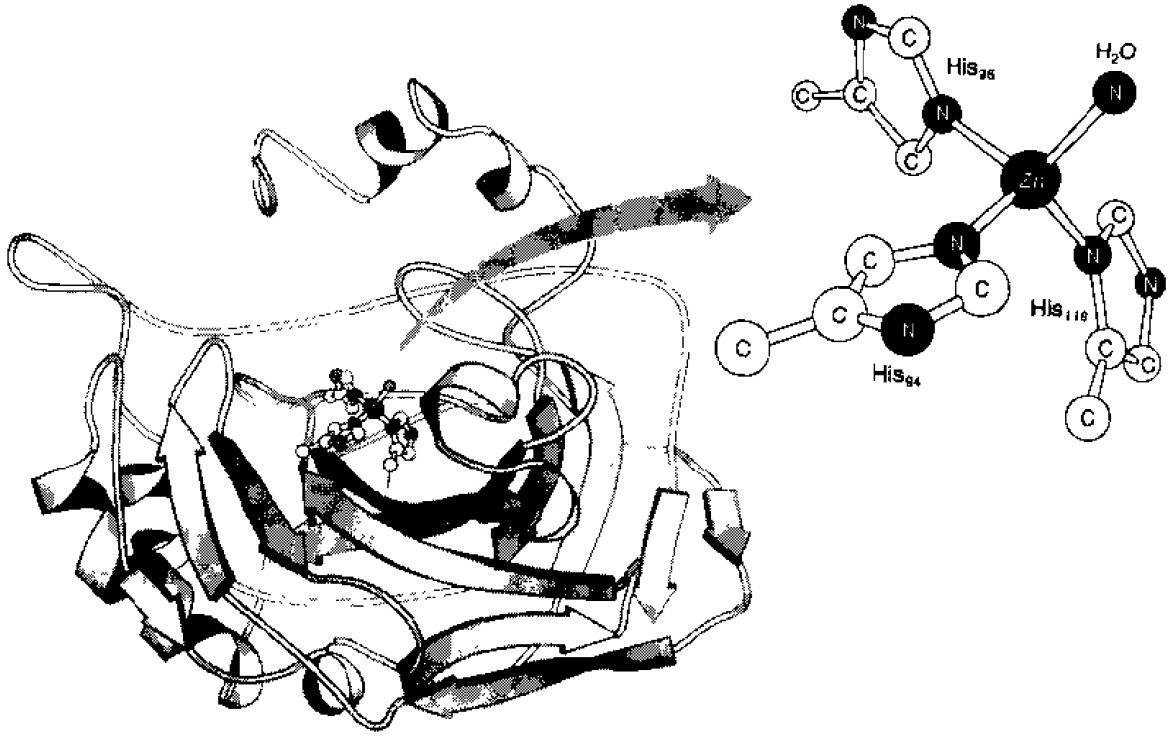


图 10.8 碳酸酐酶的结构和锌部位的几何构型

碳酸酐酶反应(式 10.1)的动力学依赖于 pH，高 pH 时反应较快，在基团调节下的表观 pK_a 接近 7.0。对上述观测最简单的且广为接受的解释是，该反应像刚讨论过的羧肽酶(式 10.2)那样，形成与锌键合的氢氧根离子。此假设还为若干阴离子抑制该反应的观测所支持，推测是和水配体竞争锌的开放配位位置。一个基于锌氢氧根活性的简单机理示于图 10.9 中。

该机理虽能解释碳酸酐酶反应的若干方面，但却不能阐明反应速率极快的原因。已经注意到，酶能使速率加快到每秒百万次，此数值显然与下述理由有关。正如早先讨论过的，速率依赖于某一基团，可能是和锌键合的水，滴定的 pK_a 接近 7.0。考虑式 10.6 所示的平衡：

$$PZn\text{-}(OH_2) \rightleftharpoons PZn(OH^-)+H^+ \qquad (10.6)$$

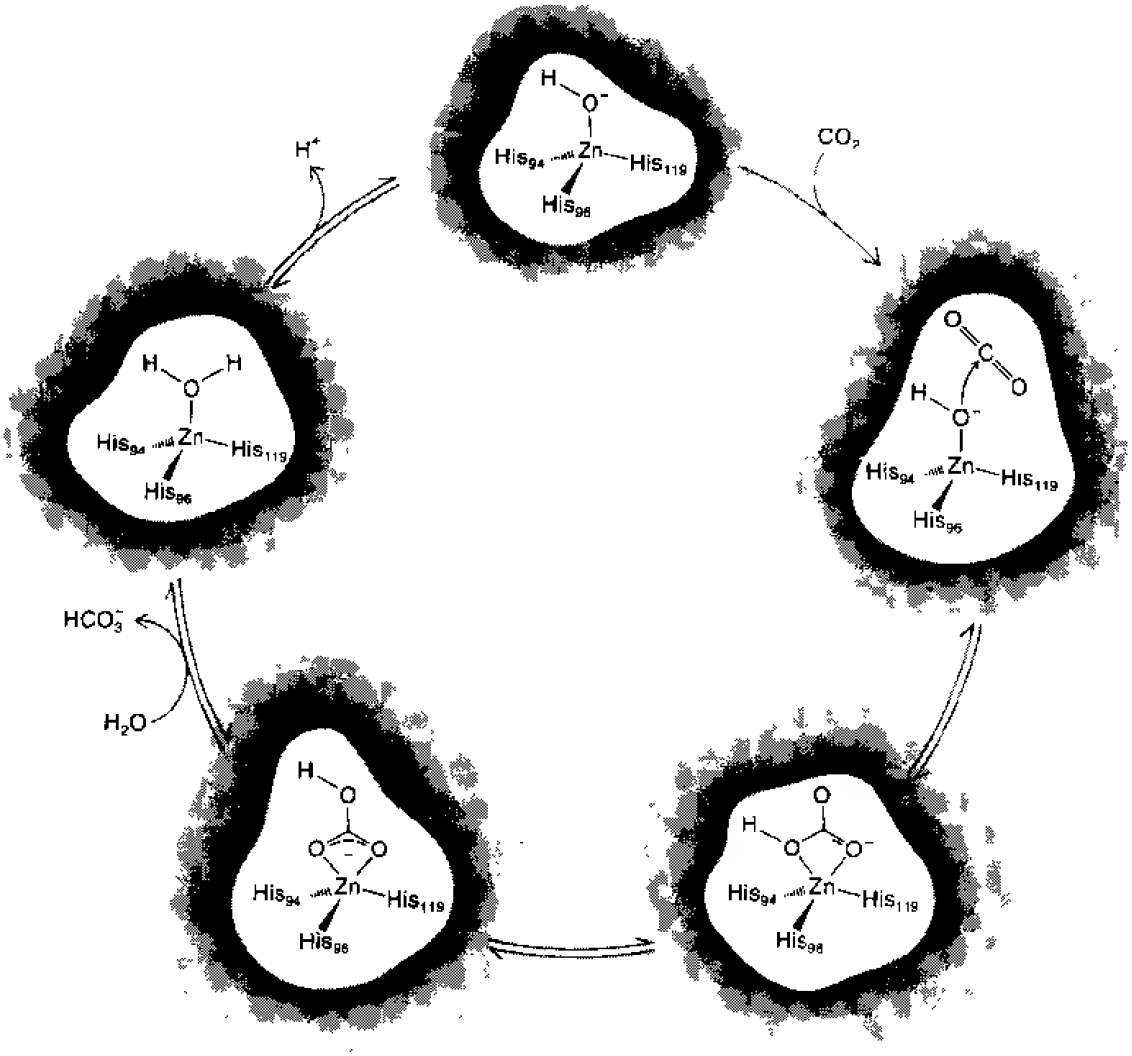


图 10.9　碳酸酐酶使二氧化碳水合的机理图示

若该反应总的平衡常数为 10^{-7}，而逆反应受扩散的限制，因此，正反应的速率至多为 $10^{4}\ s^{-1}$，不可能再快。为了使反应进行得比上述速率更快，除水或氢氧根以外的缓冲剂组分，必须参与和锌键合的水的去质子。这个结论已由实验验证，在缓冲剂浓度低时，反应速率确实依赖于缓冲剂的浓度。另外的研究指出，去质子作用可能在若干步骤中进行，而其他的蛋白质侧链，如组氨酸，则往复传递质子以维持和介质的平衡。

一旦金属-氢氧根单元形成，二氧化碳的结合（可能并不直接在金属部位）就能发生，接着氢氧根的亲核进攻产生和金属键合的碳酸氢根。该产物被水取代，完成循环，而以上提到的质子传递则不包括在内。

和锌键合的水分子 pK_a 值的降低，对上述反应有决定性的意义。正如第 8 章讨论过的那样，低 pH 的碳酸酐酶部位是电荷最高的单核部位之一，因为所有的配体均为中性的。这个特征有利于释放质子，它能降低正电荷。结果，配位水分子的 pK_a 接近 7，和游离水分子的 14 及 $[Zn(OH_2)_6]^{2+}$ 在水溶液中的 10 相比，是非常低的。

10.3 氧化还原酶:醇脱氢酶

醇脱氢酶催化由一级醇转化为醛的反应,该反应依赖于 NAD^+(式 10.7):

$$RCH_2OH + NAD^+ \rightleftharpoons RCHO + NADH + H^+ \qquad (10.7)$$

上述反应虽属氧化还原化学,但却用到了含锌的酶。它的作用是在氢负离子转移步发生前,结合和活化底物分子。这个作用很重要,如同在羧肽酶和碳酸酐酶中那样,因而对它感兴趣。

肝醇脱氢酶(LADH)含有两条 40 kDa 的单多肽亚基,每一条又含 2 个锌(Ⅱ)离子,它们处于分立域。其中的一个 Zn(Ⅱ)离子位于催化域,它也和基本的辅酶 NAD^+ 结合在一起,并和 2 个半胱氨酸根的硫原子、一个组氨酸的氮原子和一个水分子配合。另一个锌的 4 个配体是半胱氨酸的硫醇根,它不能接近溶剂。这后一个金属离子起结构作用,它的性质不再作进一步的讨论。马的肝醇脱氢酶的结构,已由 X 射线晶体学测定,并示于图 10.10 中。

图 10.10 肝醇脱氢酶二聚体的结构和锌的催化部位(左)及结构(右)图

具有催化功能的锌,位于一口袋埋藏在距蛋白质表面约 20 Å 深处,靠近 2 个区域的接合处,其中的一个进行催化作用,而另一个则为辅酶的所在处。上述口袋和底物结合,如同辅酶的

烟酰胺部分那样。与底物结合的口袋示于图 10.11 中。关于锌离子在 LADH 中的作用，现已有相当多的报道。辅酶并非一定要和锌结合，因为即使将有催化作用的锌从酶中去除，NADH 仍占据它原来的部位。另一方面，醇底物通过它们的氧原子直接和锌结合，该过程伴随着失水和配体的脱质子形成配位的 RO^-。LADH 和对-溴代苯甲基醇配合物的结构已由 X 射线进行测定，其中 Zn—O 键距为 2.1Å。加上锌的其他配体，完成了畸变四面体的结构，Zn···N 和 Zn—S 键长分别为 2.1Å和 2.3Å。

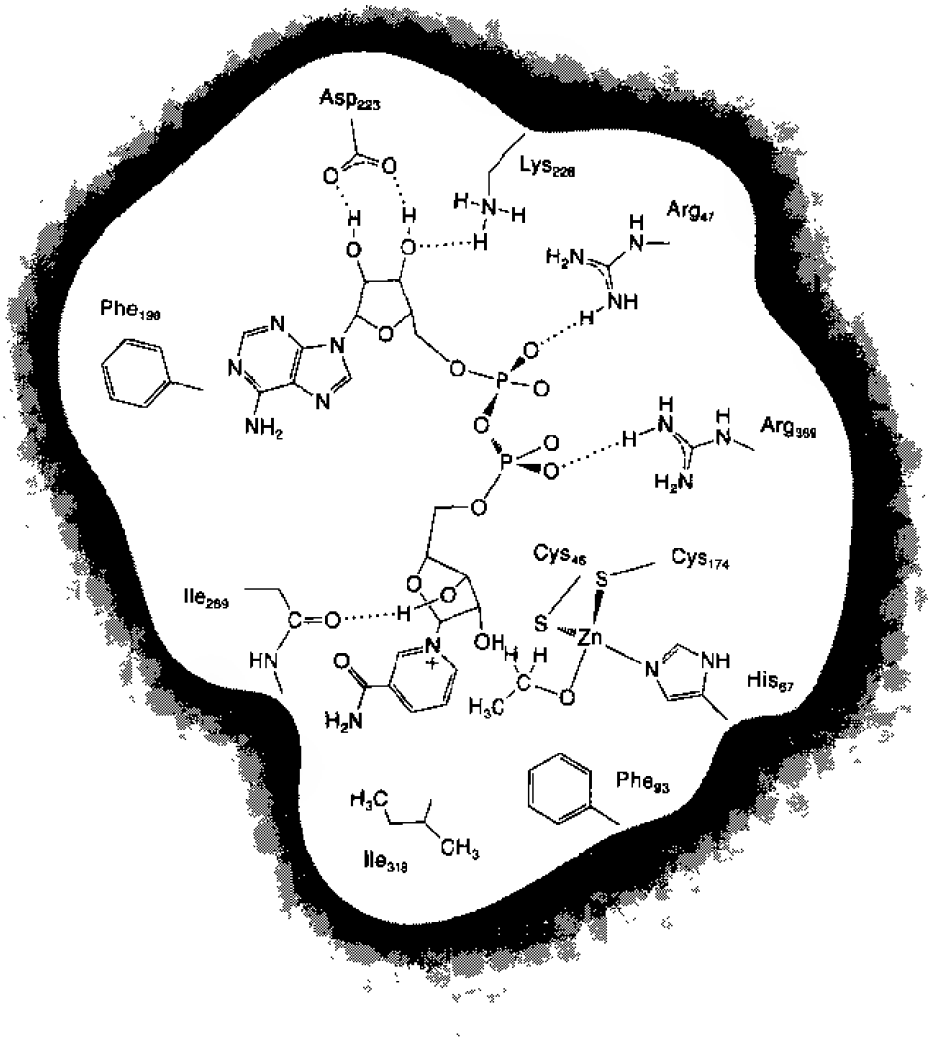


图 10.11　肝醇脱氢酶中 NAD^+ 的结合部位图

辅酶 NAD^+ 和 LADH 的结合，伴随着蛋白质的构型由开放式转变为闭合式。该构型和二聚体的核心部分相比略有差异，它的催化域相对转动了 10°角。这种构型的变化有利于和底物结合的口袋定位于距辅酶适当的距离和方向上，以促进酶机理中关键的一步，即将氢负离子从醇的 α-碳上转移到烟酰胺的环上。酶机理中氢负离子转移的一步示于图 10.12 中。随着氢负离子的转移，产物和 NADH 从酶上解离下来，因而可再结合底物的分子和辅酶。看来，锌具有双重的作用，即促进醇的脱质子，由于积累了负电荷使它成为较好的氢负离子给体，另一方面将底物定位于活性部位，最大限度地满足立体电子效应，以使氢负离子直接转移到辅酶上去。

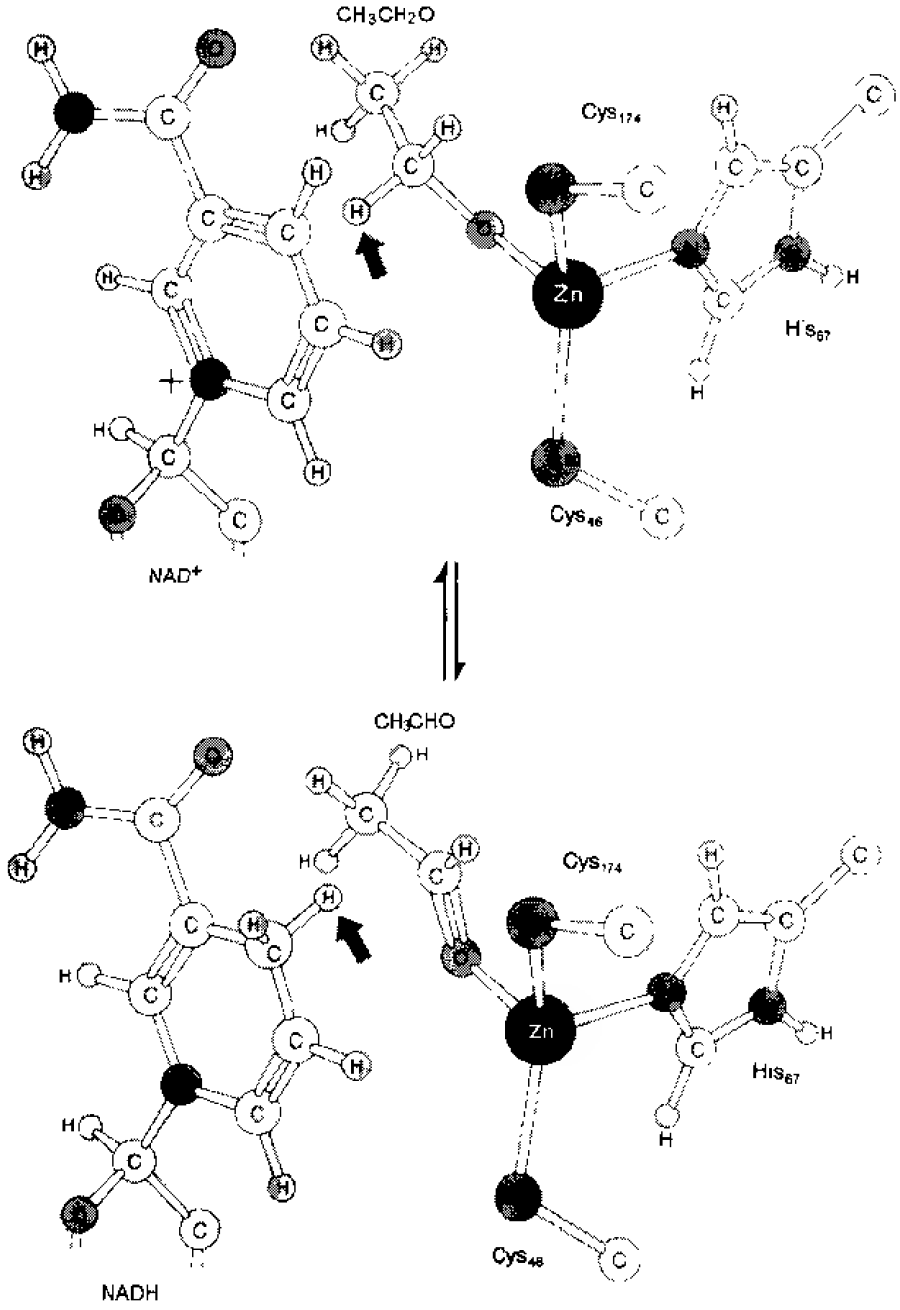


图 10.12　酶机理中氢负离子的转移

氢负离子从与锌键合的乙醇基离子转移到 NAD^+ 上，形成乙醛和 NADH（转移的氢负离子由箭头指示）

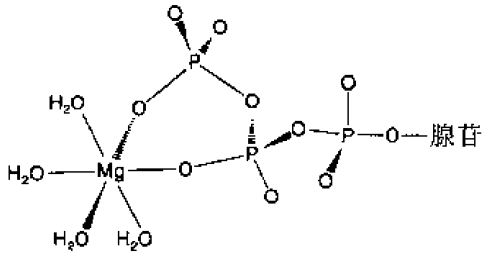
从活性部位挤掉和底物结合的水，能保持锌离子的配位数和几何构型，并从活化的底物分子附近去掉了一个潜在的活性分子。锌的双重作用，如同一般的 Lewis 酸，同时使醇底物定位，模拟它在酶中的功能，这在本章的前面已述及。根据大多数已知的锌醇脱氢酶中都含一个组氨酸的氮和两个半胱氨酸的硫配体的事实，可以认为，为了酶功能的需要，它们能使金属离子的电子性能处于最佳状态。

10.4 核苷酸活化作用

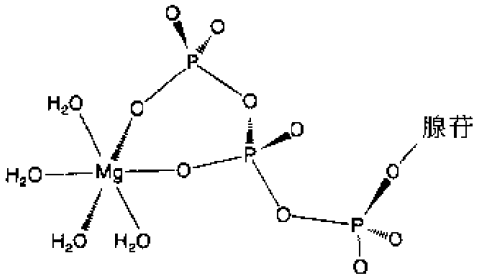
在核酸的代谢中，含多种锌酶，特别是磷酸二酯酶（phosphodiesterase）和核酸酶（nuclease）。属于锌酶一类的，已知的转移酶有 DNA 和 RNA 聚合酶和逆转录酶，这些蛋白质催化由单核苷三磷酸根组装单元形成聚合物。因此，锌催化的化学是分子生物学关键反应的基础。大多数这些重要体系的详细机理还有待于建立。

所有作用于核苷酸的酶，如 ATP，基本上都需要 Mg^{2+}（或 Mn^{2+}替代）来活化，由于这些金属离子独特的作用，它们能结合和稳定多磷酸根部分。通过和这些基团形成相对弱的配合物［$K_s \approx 10^4 (mol/L)^{-1}$］，上述金属能起一种或一种以上的下列作用：它们能使底物稳定在一种适宜于结合酶的构型中，类似于这些金属在稳定核酸结构中的功能，如第 7 章讨论的那样；它们能将底物定位于所形成的构型，以便发生反应；最后，它们能通过和多磷酸根基团结合，稳定反应的离去基团。

在这些情况下形成的配合物通常是螯合物，如图 5.18 所示。不幸的是，部分原因由于它们在动力学上的活性，很难得到这些镁配合物详细的结构信息。已经制备并从结构上表征了若干动力学上惰性的 Cr（Ⅲ）和 Co（Ⅲ）核苷酸配合物，然而，这些配合物常以酶的抑制剂作用，需要 Mg（Ⅱ）核苷酸底物或辅因子，因而此类结构合理的模型仍要由镁来形成。该金属总是和磷酸根的氧原子而不是和核酸碱基配位，此与从软硬酸碱角度考虑的硬的 Mg^{2+}离子一致。最普通的同分异构体是 β，γ-双齿螯合物，其中金属离子和末端（γ）端梢的磷酸根氧原子配位以及和 ATP 内部（β）的磷酸根残基配位。形成的螯合物环使 β-磷酸根基团变为手性，形成的两种异构体分别标以 Λ 和 Δ 符号，如图 10.13 所示。这种命名法不应与八面体的三种螯合配合物的命名法混淆（见第 5 章）。



Λ 异构体



Δ 异构体

图 10.13　Mg^{2+}通过与 ATP 的 β 和 γ 磷酸根键合所形成的 Λ 和 Δ 立体异构体

有迹象表明，酶运用专一的异构体来处理 Mg(ATP)配合物。$[Co(NH_3)_4(\beta,\gamma\text{-ATP})]$的 Λ 异构体和 Δ 异构体已经合成，并和己糖激酶作用，它通常用 Mg(ATP)使葡萄糖转变为 6-磷酸葡萄糖，并产生 Mg(ADP)。在分析产物时，发现$[Co(NH_3)_4(\beta,\gamma\text{-ATP})]$的 Λ 异构体转变为$[Co(NH_3)_4(\beta,\gamma\text{-ADP-6-磷酸葡萄糖})]$，但 Δ 异构体却未发生反应。含钴的产物在降解到 Λ-$[Co(NH_3)_4(\beta,\gamma\text{-PPP})]$后，用晶体法测定其绝对构型。因此，镁在相当大的程度上和锌类似，能和底物分子结合，使之活化以进行磷酸二酯键的断裂，此为一般的 Lewis 酸性的结果，并能将它定位于适宜的构型以利于和酶催化单元的结合。很可能大多数需要镁的酶，在与底物结合和活化时类似地都运用了这些原则。

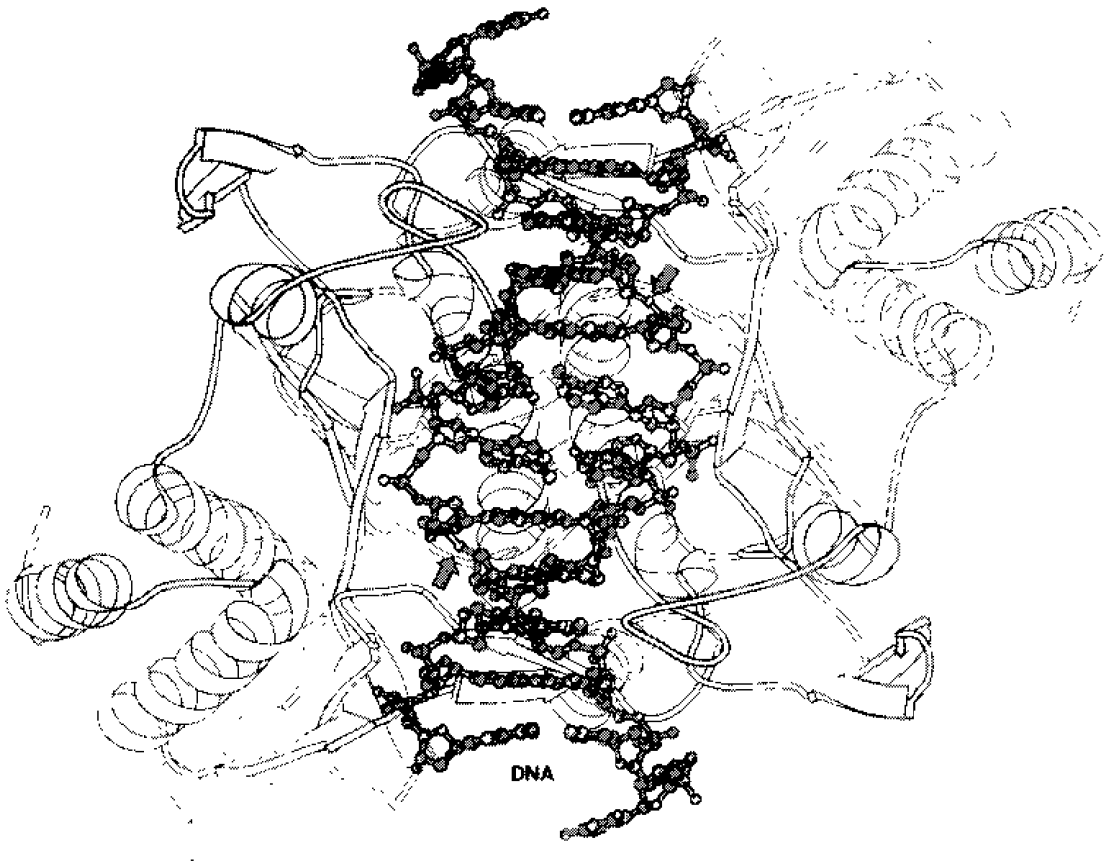


图 10.14　Mg^{2+}不存在的情况下测定的限制性内切酶 Eco RI 和双螺旋 DNA 键合的晶体结构

加入 Mg^{2+}后，磷酸二酯键被断裂的情况用箭头标出

生物无机化学家控制底物上的酶被 Mg^{2+}离子活化这种相关性的能力，有时能用于促进对某一机理特征的研究。一个实例是测定限制性内切酶 Eco RI 及其底物间形成的配合物的几何构型。在 Mg^{2+}存在下，键合的寡核苷酸能被断裂，阻碍了晶体的测定。然而，当晶体在 Mg^{2+}不存在的情况下生长，则得到一少见的蛋白质-底物配合物，其结构示于图 10.14 中。

习　题

1. 试提出可能的理由说明为什么三价离子，如 Fe(Ⅲ)或 Mn(Ⅲ)，未能被广泛地用作底物的结合与活化的水解金属酶。
2. 图 10.7 展现了一对金属离子如何共同起作用以活化底物发生水解作用。脲酶是一种催化尿素水解，形成铵和氨基甲酸酯离子的酶，如下式所示。脲酶的活性部位含一对镍离子，彼此相距 4 Å 以内。试用本章阐述的原理，提出该酶中镍催化尿素水解机理的假设。

3. 硫代磷酸酯基团(见图 3.21)已被结合到寡核苷酸。试讨论该取代作用中，磷酸二酯酶、核酸酶和其他作用于磷酸酯的酶机理可能的细节。
4. 在本章讨论的实例中，频频出现氨基酸侧链并未与金属离子配位，但却参与了酶的机理。试对这些实例中的任何一例，指出残基特有的变化，你可用定点突变来研究，并讨论这些修饰如何对催化机理提供额外的洞察。
5. 有些蛋白酶，如胰凝乳蛋白酶，在它们的活性部位并不含金属离子。然而，它们有某些其他的功能能促进肽键的断裂。反应过程经历一丝氨酸羟基对肽羰基的亲核进攻，底物的羰基定位于肽 NH 部分接近一簇合物。试将这些基团在催化过程中可能起的作用与锌在羧肽酶中起的作用相比较。

参 考 文 献

一般参考文献

I. Bertini. 1983. "The Coordination Properties of the Active Site of Zinc Enzymes." In I. Bertini, R. S. Drago, and C. Luchinat, eds., *The Coordination Chemistry of Metalloenzymes: The Role of Metals in Reactions Involving Water, Dioxygen, and Related Species. Proc. NATO Adv. Stud. Inst.* D. Reidel, Dordrecht, Holland, 1~18.

D. W. Christianson. 1991. "Structural Biology of Zinc," in C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, D. Eisenberg, and F. M. Richards, eds., *Advances in Protein Chemistry*, Volume 42. Academic Press, San Diego, 281~355.

J. E. Coleman. 1992. "Zinc Proteins: Enzymes, Storage Proteins, Transcription Factors, and Replication Proteins." *Annu. Rev. Biochem.* 61, 897~946.

T. G. Spiro, ed. 1983. *Zinc Enzymes*. Wiley-Interscience, New York.

J. Suh. 1992. "Model Studies of Metalloenzymes Involving Metal Ions as Lewis Acid Catalysts." *Acc. Chem. Res.* 25, 273~279.

B. L. Vallee and D. S. Auld. 1990. "Active-Site Zinc Ligands and Activated H_2O of Zinc Enzymes." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 220~224.

水解酶

D. S. Auld, J. F. Riordan, and B. L. Vallee. 1989. "Probing the Mechanism of Carboxypeptidase A by Inorganic, Organic, and Mutagenic Modifications," in H. Sigel, ed., *Action of Interrelations Among Metal Ions Enzymes, and Gene Expression. Metal Ions in Biological Systems*, Volume 25. Marcel Dekker, New York, 359~394.

D. W. Christianson and W. N. Lipscomb. 1986. "X-ray Crystallographic Investigation of Substrate Binding to Carboxypeptidase A at Subzero Temperature." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7568~7572.

D. W. Christianson and W. N. Lipscomb. 1989. "Carboxypeptidase A." *Acc. Chem. Res.* 22, 62~69.

S. J. Gardell, C. S. Craik, D. Hilvert, M. S. Urdea, and W. J. Rutter. 1985. "Site-Directed Mutagenesis Shows That Tyrosine 248 of Carboxypeptidase A Does Not Play a Crucial Role in Catalysis." *Nature* 317, 551~555.

H. Kim and W. N. Lipscomb. 1990. "Crystal Structure of the Complex of Carboxypeptidase A with a Strongly Bound Phosphonate in a New Crystalline Form: Comparison with Structures of Other Complexes." *Biochemistry* 29, 5546~5555.

裂解酶：碳酸酐酶

A. E. Eriksson, T. A. Jones, and A. Liljas. 1988. "Refined Structure of Human Carbonic Anhydrase II at 2.0 Å Resolution." *Proteins: Struc., Func. Genet.* 4, 274~282.

A. E. Eriksson, P. M. Kylsten, T. A. Jones, and A. Liljas. 1988. "Crystallographic Studies of Inhibitor Binding Sites in Human Carbonic Anhydrase II: A Pentacoordinate Binding of the SCN^- Ion to the Zinc at High pH." *Proteins: Struc., Func. Genet.* 4, 283~293.

O. Jacob, R. Cardensas, and O. Tapia. 1990. "An *ab initio* Study of Transition Structures and Associated Products in $[ZnOHCO_2]^+$, $[ZnHCO_3H_2O]^+$, and $[Zn(NH_3)_3HCO_3]^+$ Hypersurfaces: On the Role of Zinc in the Catalytic Mechanism of Carbonic Anhydrase." *J. Am. Chem. Soc.* 112, 8692~8705.

Y. Xue, J. Vidgren, L. A. Svensson, A. Liljas, B.-H. Jonsson, and S. Lindskog. 1993. "Crystallographic Analysis of Thr-200 → His Human Carbonic Anhydrase II and Its Complex with the Substrate, HCO_3^-." *Proteins: Struc., Func. Genet.*, 15, 80~87.

核苷酸活化作用

D. Dunaway-Mariano and W. W. Cleland. 1980. "Preparation and Properties of Chromium (III) Adenosine 5'-Triphosphate, Chromium (III) Adenosine 5' Diphosphate, and Related Chromium III Complexes." *Biochemistry* 19, 1496~1505.

R. B. Martin. 1990. "Bioinorganic Chemistry of Magnesium,' in H. Sigel ed., *Compendium on Magnesium and Its Role in Biology, Nutrition, and Physiology. Metal Ions in Biological Systems*, Volume 26. Marcel Dekker, New York, 1~14.

氧化还原酶：醇脱氢酶

H. Ekland, J.-P. Samama, L. Wallén, C.-I. Brändén, Å. Åkeson, and T. A. Jones. 1981. "Structure of a Triclinic Ternary Complex of Horse Liver Alcohol Dehydrogenase at 2.9 Å Resolution." *J. Mol. Biol.* 146, 561~587.

T. D. Hurley, W. F. Bosron, J. A. Hamilton, and L. M. Amzel. 1991. "Structure of Human $\beta_1\beta_1$ Alcohol Dehydrogenase: Catalytic Effects of Non-Active-Site Substitutions." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8149~8153.

Y. Pocker. 1989. "Alcohol Dehydrogenase: Structure, Catalysis, and Site-Directed Mutagenesis," in H. Sigel ed., *Interrelations Among Metal Ions, Enzymes, and Gene Expression. Metal Ions in Biological Systems*, Volume 25. Marcel Dekker, New York, 335~358.

第 11 章　原子和基团的转移化学

11.1　双氧输运
11.2　氧原子转移反应：Fe
11.3　氧原子转移反应：Mo
11.4　双氧的其他反应和副产物
11.5　与辅酶 B_{12} 相关的反应

在原子和基团转移的化学中，可时发生底物的结合和氧化还原变化，即使总反应并无净的氧化还原变化。质子-电子转移步的偶合能使氧化还原电位处于恰当的生物学范围。不同的氧化还原活性基团、Lewis 酸或碱以及原子转移单元定位于活性部位相互接近处，以便通力协作使艰难的总转化得以实现。底物和其他蛋白质的相互作用，能在适当的电位和时间，将电子转移引入活性部位，以进行酶的催化。为了促进两电子转移过程，发展了一系列有战略意义的举措，包括用特定的金属、金属-卟啉单元或双金属中心。金属中心可用以产生或摧毁自由基物种，在金属中心改变配位几何型的同时，伴随着氧化还原反应的发生，能使蛋白质发挥其变构功能。双氧的生物无机化学为上述原理提供了卓越的例证。

前两章我们考察了若干体系，其中的金属中心或作为电子源，或作为一般的 Lewis 酸。这一章我们将转而关注金属蛋白质中底物的结合伴随着氧化还原变化，即使总反应并无净的氧化态的改变。在这一范畴，有许多最重要的金属蛋白质的功能，包括原子、分子和基团的转移。双氧的反应和它的代谢产物是这些功能中最大的一部分。考察这些体系，可揭示许多关键的原理。由于从金属离子移去电子的氧化作用，伴随着正电荷的升高，因而常同时发生配体的失质子。由于这种质子-电子转移反应的偶合，体系能被调整到有利于连续氧化，而金属中心的氧化还原电位不需要保持在 $-0.8\sim+0.8$ V 的范围外，这是大多数细胞可以达到的数值。类似地，当发生还原时，通常带负电荷，底物分子仍和金属中心键合，因而它可转变为质子化，再次使电荷的差距降至最小。两电子转移过程可用特定的金属，如钼，加以实现，它很容易进行多电子氧化还原水平的改变，例如，$M^{(n+2)+}$ 和 M^{n+} 间的变化。或者选择易发生氧化还原金属的双金属中心，像铁或铜，或上述金属中的一个与氧化还原活性配体，如与卟啉结合，对完成两电子转移格外有意义。

本章讨论的实例所揭示出的另一个重要的原理是：由配体传递的氧化还原反应所导致的金属中心几何构型的变化，可触发邻近蛋白质链的协调移动，产生协同动作。

基团转移反应也能通过金属中心产生自由基而发生。这里包括从蛋白质或辅酶组成中衍生的酪氨酰和以碳为中心的自由基，如同由水或双氧介质组成中分别产生羟基或超氧自由基那样。生物无机体系独特的性质，即具有结合并通过金属传递氧化还原变化以转移电子的双重能力，推动了这方面化学的发展。

11.1 双氧输运

我们从一种重要的但并非酶的作用，即双氧的可逆结合开始讨论，双氧的可逆结合在本质上是输运和存贮氧分子的功能(图 1.2)。众所周知，在无机化学中钴的配合物能进行这类反应，但在生物学中，这种过程似乎仅有铁和铜中心能进行。已知有三种输运和存贮 O_2 的体系，且都用到了金属蛋白质。这三种双氧载体为血红蛋白(hemoglobin，Hb)、血蓝蛋白(hemocyanin，Hc)和蚯蚓血红蛋白(hemerythrin，Hr)。它们在所有的脊椎动物和许多非脊椎动物、节肢动物、软体动物及四门海洋非脊椎动物中都有各自的功能。其中仅有血红蛋白有一铁-卟啉基团，该单元已成为血红素专门名词的同义语，尽管这个名词是从希腊词根意即"血"演变而来。在功能核心部分，血蓝蛋白有两个铜原子而蚯蚓血红蛋白则有两个非血红素铁原子。这三种双氧载体的某些性质列于表 11.1 中。O_2 分子由肌红蛋白(myoglobin，Mb)和肌蚯蚓血红蛋白(myohemerythrin，myo Hr)储存在组织，如肌肉中。它们的金属核心结构类似于相应的输运蛋白质。在它们的氧合状态，这三种蛋白质体系的颜色均很深。

表 11.1 氧载体蛋白质的若干性质

性　质	血红蛋白	蚯蚓血红蛋白	血蓝蛋白
金属	Fe	Fe	Cu
金属在脱氧蛋白质中的氧化态	(Ⅱ)	(Ⅱ)	(Ⅰ)
金属：O_2	$Fe:O_2$	$2Fe:O_2$	$2Cu:O_2$
颜色(氧合形)	红	紫粉红	蓝
颜色(脱氧形)	红紫	无色	无色
Fe 的配位	卟啉环	蛋白质侧链	蛋白质侧链
分子量	65 000	108 000	400 000～20 000 000
亚基数	4*	8	若干

*在有些物种(例如吻沙蚕属)中，血红蛋白为单体；在其他物种(例如沙蠋属)中，它们为多亚基低聚物，分子量达数百万。

在 Hr 和 Hc 中，双氧结合反应系指 O_2 氧化加成到双金属中心，形成配位的过氧基团。对 Hb，从金属到键合的双氧分子的电子转移较少，有人认为部分是由于以超氧离子键合所致。所有三种蛋白质的还原形、无双氧形归结为脱氧(deoxy)，双氧键合形为氧合(oxy)，而在功能上无活性的氧化态为金属形(met)。我们从最高级生物体的 Hb/Mb 金属蛋白质开始讨论。

11.1.a 血红蛋白和肌红蛋白

(i) **结构**。肌红蛋白(Mb)是 O_2 结合蛋白，主要存在于脊椎动物的肌肉组织中。它含一条由 153 个氨基酸组成的多肽单链，即所谓的珠蛋白。珠蛋白由 7 段 α-螺旋和 6 段非螺旋构成(图 11.1)。多肽链通过组氨酸残基的咪唑环和双氧结合辅基，即铁(Ⅱ)卟啉Ⅸ配位相连。上述卟啉环示于图 1.2 中。抹香鲸肌红蛋白所有三种形式(脱氧、氧合和金属形)的结构均已测定。脱氧 Mb 具有五配位的铁(Ⅱ)中心，其中的金属原子位于由 4 个吡咯环给体氮原子构成的平

图 11.1　肌红蛋白的结构

面外0.42 Å，朝向键合的咪唑基团，称为血红素的近端侧面。结合双氧后，铁原子移向 FeN_4 面。在氧合 Mb 中，双氧分子以端接式和铁键合，形成弯折的结构，Fe—O—O键角为 115°。

血红蛋白(Hb)在血液中输运 O_2，它在肺部从空气中摄取双氧，并在组织中将双氧释放给 Mb。血红蛋白为多亚基蛋白质，有两条 α 和两条 β 多肽链。每一条链都有一个铁卟啉Ⅸ基团与邻近的组氨酸咪唑残基相连，如同在 Mb 中那样。在脱氧 Hb 中，铁位于卟啉环平面外 0.36～0.40Å 处，当结合双氧后，移近平面 ±0.12 Å。

在 Hb 和 Mb 中，都有一组氨酸位于 O_2 结合口袋，远离配位的咪唑碱基一侧(远侧)。X 射线和中子衍射对氧合肌红蛋白的研究指出，在配位的双氧分子和远侧组氨配残基 N—H 键的质子间形成氢键。由于配位双氧原子弯折的角度，使 Fe—O—O···H—N 单元能安然容纳下。然而，在 Mb 和 Hb 的一氧化碳加合物中，X 射线证实为一畸变的结构，其中 Fe—C≡O 角或是弯折的，或更像是与邻近的组氨酸 N—Fe 键轴间形成一角度，以避免和远侧组氨酸的空间接触。可见，大自然很聪明地把铁卟啉中心恰当地安排在 Hb 和 Mb 中以结合 O_2，而不像有毒的替代物 C≡O 那样，后者通常比双氧和金属配合物的结合更紧密。

(ii) **双氧结合反应**。Hb 和 Mb 可能是研究得最深入的蛋白质，它们曾是无数波谱、热力学和动力学研究的对象。它们的光谱特征是卟啉环在 400～600 nm 范围内强的 $\pi\rightarrow\pi^*$ 跃迁，即著名的 Soret α 带和 β 带(见表 4.6)，该吸收带对氧合状态颇为敏感。振动拉曼光谱对配位的双氧分子及其 ^{18}O 取代物的研究，确定 O—O 伸缩带位于≈1105 cm^{-1} 处。该数值是配位超氧离子(O_2^-)的特征(表 11.2)，由此提出 MbO_2 和 HbO_2 加合物最好表征为该配体和铁(Ⅲ)的配合物。这些离子间的磁偶合使基态为反磁性的，$S=0$。可见，双氧与脱氧 Hb 或 Mb 的配位，伴随着电子的转移形成超氧离子，它反过来被与远侧咪唑质子的氢键所稳定，这已在前面述及。

表 11.2　双氧物种的振动和几何构型的性质

物　种	$\nu_{(O-O)}/cm^{-1}$	$d_{(O-O)}/Å$
O_2^+	1905	1.12
O_2	1580	1.21
O_2^-	1097	1.33
O_2^{2-}	802	1.49

Hb 和 Mb 极其重要的生理功能是大自然设计的完美复杂的生物无机体系，其中双氧在肺部与 Hb 结合，然后在组织中转移到 Mb 或怀孕哺乳动物子宫中胎儿的 Hb。该体系的核心是当脱氧 Hb 转变为氧合 Hb 时，铁朝着卟啉环平面移动，它的作用犹如协同多亚基血红蛋白和双氧的结合。推测该蛋白质有两种不同的四级结构，松弛的标以 R(relax)，拉紧的标以 T(tense)。前者对 O_2 有很高的亲和性，类似于离析出的亚基；而后一种拉紧态的则对 O_2 的亲和力降低。这两种形态彼此处于平衡。当 4 条亚基未绑扎在一起时，主流为 T 态，现认为在这种状态下，亚基间的相互作用能强迫邻近的组氨酸抵制移动到卟啉环的平面，从而降低了 O_2 的结合常数。在约 2 个 O_2 分子和血红蛋白分子键合后，蛋白质的四级结构转变为 R，处在 R 态时，这种强制力就松弛了，有利于双氧和剩下的两条亚基结合。

该机理的关键在于双氧结合时，需要铁原子移至卟啉环的平面内，并把邻近的组氨酸一起拉上来。图 11.2 给出了某些铁卟啉的自旋态。在脱氧 Hb 中，铁(Ⅱ)为高自旋($S=2$)的，它的共价半径对嵌入 4 个氮原子构成的平面来讲太大。加合 O_2 形成 $Fe^{Ⅱ}$-O_2^- 加合物后，铁的共价半径减小，以致可移进卟啉环的平面。尽管对 Hb T 态模型的细节尚有争论，但看来由亚基间相互作用强加于铁卟啉部位的强制力，很可能降低了双氧结合的亲和力，因此，需要有一个铁

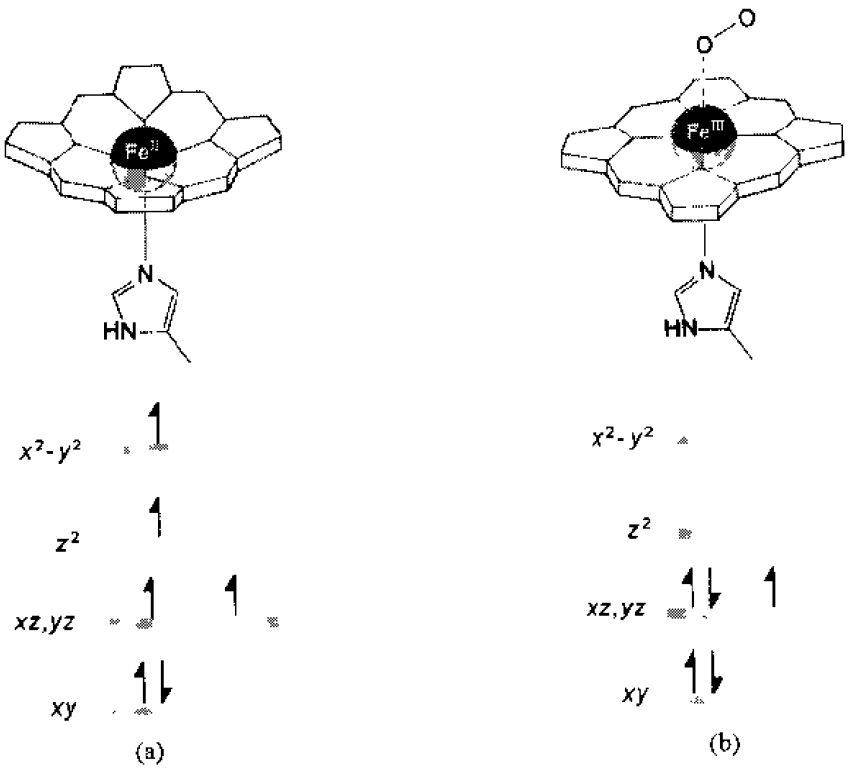


图 11.2　双氧结合到铁卟啉时所发生的结构和自旋态变化的图示

(a) 高自旋亚铁脱氧形；(b)低自旋正铁氧合形

配位层实质性的结构重组反应。结果，剪裁出适宜于金属配位和蛋白质结构的化学，为在各种不同的生物条件下 O_2 的结合及释放，创造了一个柔性的体系。低 pH 也适宜于从血红蛋白释放双氧，更有利于双氧从血液到其他组织的转移。

(iii) **模型化学**。合成铁(Ⅱ)-卟啉配合物，使其在物理和结构性质上类似于脱氧 Mb 和脱氧 Hb 的金属中心，相对而言比较简单，[Fe(TPP)(N-MeIm)]就是一例，其中 TPP＝内消旋-四苯基卟啉，N-MeIm＝N-甲基咪唑。但要得到能可逆结合双氧的模型化合物则困难得多。将 O_2 加到简单亚铁卟啉的溶液中，结果立即发生氧化还原化学反应，最终导致形成热力学上很稳定的(μ-氧)双铁(Ⅲ)物种。动力学研究提出的机理表示在式 11.1～11.4 中：

$$Fe^{II}P + O_2 \rightleftharpoons Fe^{II}P - O_2^- \tag{11.1}$$

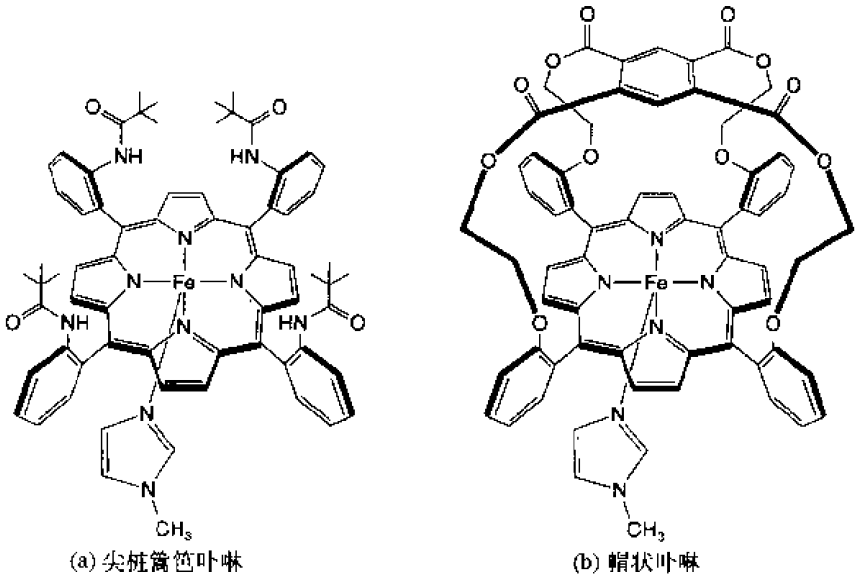
$$Fe^{II}P - O_2 + Fe^{II}P \rightleftharpoons PFe^{III} - O_2^{2-} - Fe^{III}P \tag{11.2}$$

$$PFe^{III} - O_2^{2-} - Fe^{III}P \longrightarrow 2PFe^{IV}{=}O \tag{11.3}$$

$$PFe^{IV}{=}O + Fe^{II}P \longrightarrow PFe^{III} - O - Fe^{III}P \tag{11.4}$$

其中单独的每一步随后均为多种波谱和结构的研究所证实。式中 P 代表卟啉环，罗马数字指明铁的氧化态。

可逆结合氧的亚铁卟啉 Hb/Mb 模型化合物已用多种方法实现。其中的一种是运用低温在稀的非水溶液中稳定双氧配合物。实例有 $Fe^{II}TPP(L)$，其中 L 为吡啶或 1-MeIm。这是动力学的策略，以避免热力学有利的反应 11.1 到 11.4。然而，高于－45℃，体系便不可逆地氧化。由于该分解反应有两个铁-卟啉分子参与双分子步(见式 11.2 和 11.4)，而这两步在 Hb 和 Mb 中是通过蛋白质链来防止它们发生的，对策是设置障碍阻止活性氧合铁中心彼此接近。一种处理方法是将铁-卟啉浸渍在聚苯乙烯薄膜上，和 O_2 反应后产生氧合 Hb 型的光谱，用 N_2 冲洗薄膜可使该加合物脱氧。另一种方法是运用空间因素来阻止两个铁-卟啉部分相互接近，这就是后来应用在合成上的，利用空间位阻配体来保护 O_2-结合部位，因而使所期望的 O_2 配合物能在室温下于溶液中稳定。图 11.3 展示了两个这类卟啉的结构。一个叫做“尖桩-篱笆”卟啉，因为有4个新戊酰氨取代基位于TPP的邻-苯基位置上，朝向环的同一侧，好似篱笆上树起



(a) 尖桩篱笆卟啉　　(b) 帽状卟啉

图 11.3　两个珠蛋白模型化合物的结构
它们能可逆地结合氧

的尖桩。远离尖桩在环另一侧的轴向位置上有1-甲基咪唑或吡啶，它的作用犹如一个碱。该卟啉的亚铁配合物能可逆地结合氧。帽状卟啉也一并示于图11.3中，若有大量过量的轴向碱存在，它也能类似地结合氧。在这些配合物中，苯基环取代基设置了空间障碍，防止(μ-氧)双铁(Ⅲ)单元的形成，同时提供了一个口袋，使O_2分子能位于其中。

对O_2-结合的Hb和Mb卟啉模型配合物已进行过广泛的波谱、磁性和结构的研究。热力学测定表明，模型配合物的双氧亲和力与Mb及Hb在松弛态时一样。脱氧和氧合血红素蛋白以及它们模型配合物的电子、振动、穆斯鲍尔谱和磁化率测定的结果都非常一致。此外，模型配合物还为轴向碱基对T-态血红蛋白双氧结合反应强制力的影响提供了依据。亚铁尖桩-篱笆卟啉模型配合物结合一空间位阻的轴向碱基，如1,2-二甲基咪唑，限制了咪唑环伴随着氧合作用移动的量到≈0.3 Å，相比之下，无强制力的咪唑轴向碱基，如1-甲基咪唑，则估计移动0.3～0.5 Å。结果，降低了双氧的亲和力。以上发现清楚地表明，合成模型对洞察金属蛋白质功能核心化学错综复杂细节上的巨大价值。

显然，某些尖桩-篱笆卟啉庞大的轴向配体，在固态结合双氧时具有协同作用。因此，当2-甲基咪唑作为轴向配体时可得出：固体在O_2分压低时，结合双氧的亲和力低；分压较高时，亲和力较高；而在中间状态则有协同作用。此外，在一个形式上略有差别的化合物中，在固态存在乙醇和咪唑氮间的氢键，未观测到协同作用，而且对双氧的亲和力非常低。这些观测证明了在双氧结合反应中，铁中心电子变化的重要影响，以及伴随着内部的电子转移反应影响结构变化的本领，而结构的变化能修饰邻近部位的行为。

(iv) **金属卟啉活化双氧**。若在蛋白质骨架中安排得当，双氧就能被铁卟啉辅基活化，进行一系列氧合反应。一个著名的例子是细胞色素P-450，目前，我们已经掌握许多关于氧合作用的细节。了解了蛋白质的环境如何调节铁卟啉核心的反应性能，如何进行这些不同的生物学转移，这一切对生物无机化学无疑是一个激动人心的挑战。我们将见到，在生物无机化学中，一个类似的情况发生在其他的双氧输运中心，其中的金属核也能催化氧原子转移反应。

11.1.b 蚯蚓血红蛋白

(i) **结构**。蚯蚓血红蛋白的蛋白质分子相对较易结晶，分离出的氧合Hr经最后的提纯步得到美丽的紫色针状结晶。对应于叠氮根金属形蚯蚓血红蛋白(azidomet Hr)和叠氮根金属形肌蚯蚓血红蛋白(azidometmyo Hr)的高分辨率(1.66～2.0 Å)，X射线结构已有报道，其中叠氮离子(N_3^-)和铁键合的位置即为氧合Hr中通常为O_2占据的位置。正如图11.4所示，结构中含两个八面体配位的铁原子，它们通过1个μ-氧以及2个桥式羧酸酯基团相连，后者由蛋白质链的谷氨酸和天冬氨酸残基提供。一个铁原子的3个端梢的位置和另一个铁原子的2个端梢的位置为组氨酸配体的咪唑基。叠氮离子完成了第二个铁原子的八面体配位层。由*Themiste dyscritum*而来的脱氧和氧合Hr的X射线结构，尽管还不那么精确，但和前者一致，具有五配位的铁所空缺的位置，在蛋白质的氧合形中尔后为单齿的端接式双氧所占据。短的$Fe—O_{氧合}$距离为1.78 Å，其余的Fe—O和Fe—N键长为2.05～2.25Å，此数据与蛋白质的氧化形存在高自旋d^5(μ-氧)双铁(Ⅲ)核心相符。EXAFS的研究支持上述表征，并且验证了氧合及叠氮根金属形Hr具有相同的数目和类型的配体与$[Fe_2O(O_2CR_2)]^{2+}$核键合。

(ii) **磁性和波谱性质**。表11.3概括了脱氧和氧合Hr的磁性和波谱性质。穆斯鲍尔谱和EPR谱测定脱氧Hr含2个高自旋的亚铁离子。在金属和氧合Hr中，有2个高自旋的正铁中

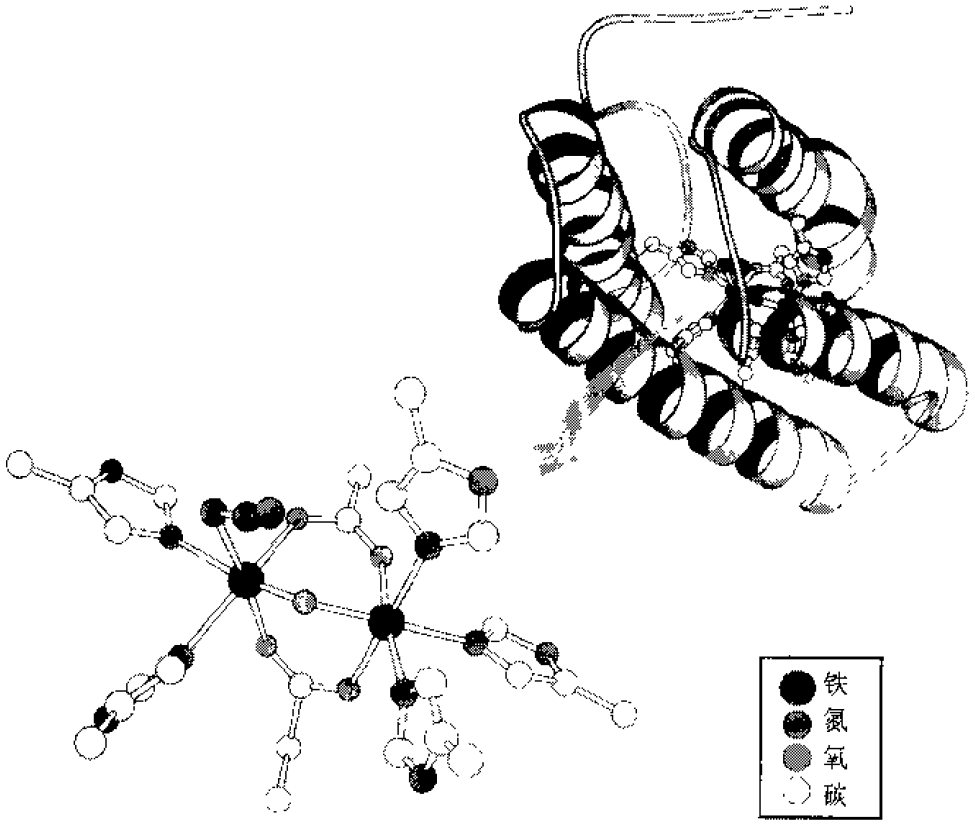


图 11.4　叠氮根金属形蚯蚓血红蛋白的结构及其双核的铁核

N_3^- 离子位于氧合蚯蚓血红蛋白中为双氧占据的位置

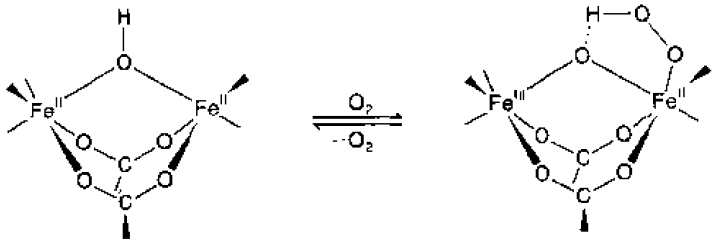
表 11.3　含双核铁中心的蛋白质及其模型的部分结构、磁性和波谱性质[a]

	氧合蚯蚓血红蛋白	脱氧蚯蚓血红蛋白	D·$(HBPz_3)_2$	D·$(TACN)_2$	[D·$(Me_3TACN)_2$]$^{2+}$
结构性质					
∠Fe—O—Fe /(°)	128	128	123.6	118.3	113.2
Fe—μO 距离/Å	1.82	1.98	1.748	1.785	1.987
Fe···Fe 距离/Å	3.24	3.57	3.146	3.064	3.32
穆斯鲍尔谱和磁性					
异构体位移/(mm·s^{-1})	0.52,0.18	1.14	0.52	0.46	1.16
四极分裂/(mm·s^{-1})	1.92,100	2.76	1.60	1.72	2.83
J/cm^{-1}	−77	−13	−121		−13
电子光谱					
LMCT(O^{2-}到 Fe)/nm	330,360 肩		262,339,358 肩	333,368 肩	
d−d/nm	750,990		523 肩,695,995		
振动光谱					
Fe—O—Fe,对称伸缩/cm^{-1}	486		528		
Fe—O—Fe,不对称伸缩/cm^{-1}	757		751	749	

[a] 表中 D 表示基团 $Fe_2O(O_2CCH_3)_2$,$HBPz_3$=氢化三(吡唑基)硼酸根,TACN=1,4,7-三氮杂环壬烷。

心，由于氧桥基的存在，呈反铁磁性偶合。这种偶合很强(对氧合和金属形 Hr，J 值分别为 -77 和 $-134\ cm^{-1}$)，故基态为反磁性，在液氦温度(4.2 K)下无净的磁性。然而，室温下，剩余顺磁性影响了蛋白质溶液的性质。共振拉曼光谱对表征氧化形 Hr 特别有价值。氧合或氢氧根金属形 Hr 的近紫外激发在 436 或 492 cm^{-1} 处产生一共振加强带，表征为 Fe—O—Fe 对称伸缩模式，因为它被 ^{18}O 取代后位移至低能方向。拉曼光谱的研究也证实了在氧合 Hr 中，O_2 以端接的形式键合 O—O 伸缩振动在 844 cm^{-1} 处，这是过氧离子的特征(表 11.2)。将氧合 Hr 暴露在 D_2O 中，结果，Fe-O-Fe 模式向高能方向位移了 4 cm^{-1}。对此的解释是，由于形成了到桥式双氧原子的氢键。

(iii) **双氧结合反应**。脱氧和氧合 Hr 的结构、磁性和波谱性质与图 11.5 所示的模型在 Hr 双核铁核结合双氧一致。在脱氧 Hr 中，有一个(μ-羟基)二(μ-羧基)双铁(Ⅱ)中心，在一个铁原子上有一个空的端梢配位位置以结合双氧，并从桥式 OH 基上转移两个电子和一个质子。形成的氧合 Hr 有一端梢的氢过氧基现和氧化形的 $\{Fe_2O(O_2CR)_2\}^{2+}$ 核的一个铁原子键合。氢过氧基(给体)的质子和 μ-氧基(受体)间形成氢键。在双金属中心上的双氧氧化加成可能通过两相继的单电子步发生，其中含一混合价态{$Fe^{II}Fe^{III}$}的中间体。正如同对 Hr 模型化合物的研究所显示的那样(见下述)，到 μ-氧基氢键的存在，使得从脱氧态到氧合态 Fe—O 键的缩短降到最低限度。该现象可限制伴随着氧合/脱氧反应、由氧化还原起动的内层重组能的量，有利于可逆地结合 O_2。氢键也使氧合 Hr 比金属形 Hr 的磁交换偶合更少。



脱氧蚯蚓血红蛋白　　氧合蚯蚓血红蛋白

图 11.5　在可逆的双氧结合时，发生在蚯蚓血红蛋白双铁核的氧化还原和结构变化图示

(iv) **蛋白质的氧化还原态**。脱氧、金属或氧合 Hr 在进行单电子氧化和还原反应时，产生的混合价态(Fe^{II}/Fe^{III})的各种形式分别标以(半金属)$_O$ 和(半金属)$_R$。尽管还不知道这些形式在 O_2 结合化学中起什么作用，但它们和相关的双核铁-氧蛋白质一样有用，因为在生物学功能中涉及混合价态的形式。

(v) **模型化合物**。Hr 的 $\{Fe_2O(O_2CR)_2\}^{2+}$ 核心结构自发自组装已在多种模型化合物中获悉。首先得到的这类化合物之一是 $[Fe_2O(O_2CCH_3)_2(HBPz_3)_2]$，其中 $HBPz_3^-$ 为氢化三(吡唑基)硼酸根阴离子，示于图 11.6 中。从表 11.3 中可见，该配合物的磁性和波谱性质和那些在叠氮根金属 Hr 中的双核铁核心极其相符。在模型化合物中的氧桥基能可逆地质子化，如式 11.5 所示，产生羟基桥双铁(Ⅲ)衍生物：

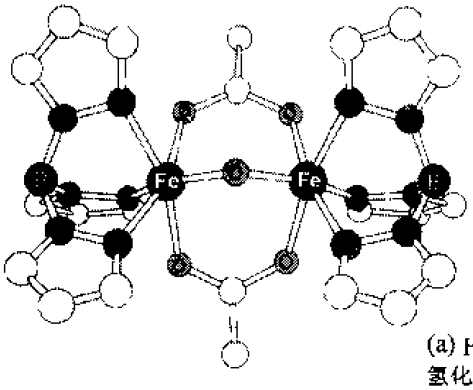
$$[Fe_2O(O_2CCH_3)_2(HBPz_3)_2] \underset{Et_3N}{\overset{HBF_4}{\rightleftharpoons}} [Fe_2(OH)(O_2CCH_3)_2(HBPz_3)_2]^+ \qquad (11.5)$$

绿-棕　　橘黄

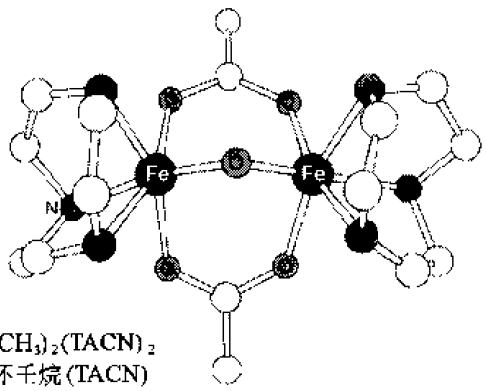
$J=-118\ cm^{-1}$　　$J=-17\ cm^{-1}$

在质子化的 μ-氧配体中，Fe—O 键长从≈1.78 Å到≈1.96 Å，同时伴随着颜色的变化和反铁磁性交换偶合常数的减小。

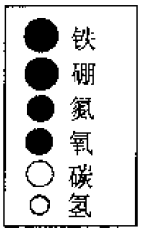
当尝试用脱氧 Hr 模型化学的方法来还原(μ-氧)二(μ-羟基)双铁(Ⅲ)模型化合物时，发生分解，产生单核的[Fe(HBPz$_3$)]。为防止上述情况的发生，用 N，N′，N″-三甲基三氮杂环壬烷配体(图 11.6)来代替氢化三(吡唑基)硼酸根。由于不利于空间作用，[Fe(Me$_3$TACN)$_2$]$^{2+}$双螯合阳离子不能形成。因此，靶配合物[Fe$_2$(OH)(O$_2$CCH$_3$)$_2$(Me$_3$TACN)$_2$]$^+$是通过自发自组装来制备的，这是由它的几何和电子结构决定的。正如图 11.6 和表 11.3 所指出的那样，该配合物是还原形或脱氧形蚯蚓血红蛋白极好的波谱和结构模型。在 Hr 模型化学中主要的遗留课题是，设法制得含 {Fe$_2$(OH)(O$_2$CR)$_2$}$^+$或{Fe$_2$O(O$_2$CR)$_2$}$^{2+}$核的双核配合物，其中一个铁原子有 3 个端梢的 N 给体配体；另一个铁原子仅有 2 个这类配体，而它能在合用的部位可逆地结合双氧或阴离子，如 N_3^-。

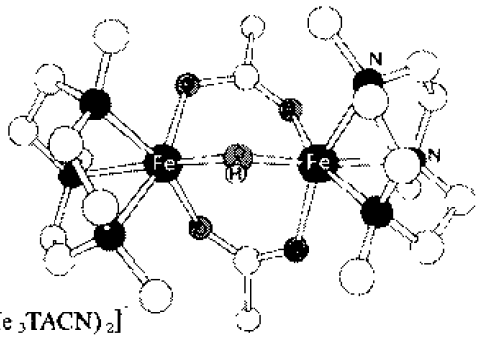


(a) Fe$_2$O(O$_2$CCH$_3$)$_2$(HBPz$_3$)$_2$
氢化三(1-吡唑基)硼酸根(HBPz$_3$)



(b) Fe$_2$O(O$_2$CCH$_3$)$_2$(TACN)$_2$
1,4,7-三氮杂环壬烷(TACN)





(c) [Fe$_2$(OH)(O$_2$CCH$_3$)$_2$(Me$_3$TACN)$_2$]$^+$

图 11.6　蚯蚓血红蛋白两个氧化形(a，b)和一个还原形(c)合成模型的结构

(vi) **具有 Hr-型核的蛋白质**。随着从结构上阐明 Hr 中存在桥式双核核心，鉴定出许多类非血红素铁蛋白具有类似于该蛋白质的金属或半金属形的波谱性质。属于这种类型的有哺乳动物和细菌的核苷酸还原酶(RR)、紫色酸性磷酸酶(PAP)，子宫铁蛋白和甲烷单加氧酶(MMO)。式 11.6～11.8 表明了由这三种酶催化的相应反应：

(11.6)

$$(RO)_2PO_2H + H_2O \xrightarrow{PAP} (RO)PO_3H_2 + ROH \qquad (11.7)$$

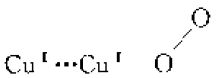
$$CH_4 + O_2 + 2H^+ + 2e \xrightarrow{MMO} CH_3OH + H_2O \qquad (11.8)$$

在这些不同的蛋白质中，包括 Hr，由羧基桥双铁中心所显示的功能多样性引人入胜。

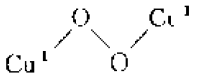
11.1.c 血蓝蛋白

(i) **结构**。血蓝蛋白为很大的蛋白质，含多条亚基。最近培养了一种从刺状龙虾(一种节肢动物)中来的 Hc 晶体，适宜于进行 X 射线衍射的研究。晶体中不对称的单元含 6 条蛋白质亚基，分子质量≈460 kDa，故难以获得高分辨的结构。该蛋白质无色的脱氧形结构已经测定，其双核铜核的化学组成示于图 11.7 中。在脱氧 Hc 中，2 个一价铜离子的每一个均和 3 个组氨酸残基配位，核间距为(3.7±0.3) Å。两个金属间的空腔正好容纳双氧分子。最初，对不同来源的 Hc 的波谱和磁性的研究，参考氧合和金属形的模型结构，认为其中的酪氨酸配体和 2 个二价铜离子桥联。然而，在刺状龙虾的晶体结构中，最近的 RO^- 基团距双核铜的部位超过 17 Å。因此，在氧合 Hc 中，似乎并不存在上述桥基，可能在其他所有的 Hc 蛋白中都不存在。

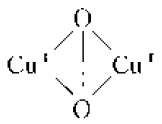
(ii) **波谱和氧化还原化学**。氧化、氧合和金属形的血蓝蛋白是多种物理方法广泛检测的对象。这两个 $d^9Cu(\text{Ⅱ})$ 离子由强烈的反铁磁性偶合着，以致在室温下，双核中心基本上是反磁性的。氧合血蓝蛋白有一个特征的强光谱跃迁发生在 345 nm 处，表征为配体到金属的电荷转移带。氧合 Hc 的光谱和圆二色谱中 450 nm≤λ≤700 nm 的峰，以及共振拉曼光谱中 803 cm^{-1} 处的带是由 O—O 伸缩振动引起的(表 11.2)，这和存在(μ-过氧基)双铜(Ⅱ)中心一致。用 ^{16}O—^{18}O 双氧同位素标记的研究，试图将



中的模式与 O_2^{2-} 配体的



结合模式加以区分。前者应有两个 O—O 伸缩带，而后者仅有一个，且仅观测到一个。近来，合成了一个模型配合物，其中 2 个铜(Ⅱ)离子由 η^2,η^2-氧基相连，如左图所示。该配合物的波谱性质，包括拉曼光谱，和氧合血蓝蛋白的极其相似。继而测定了蚤血蓝蛋白氧合形的晶体



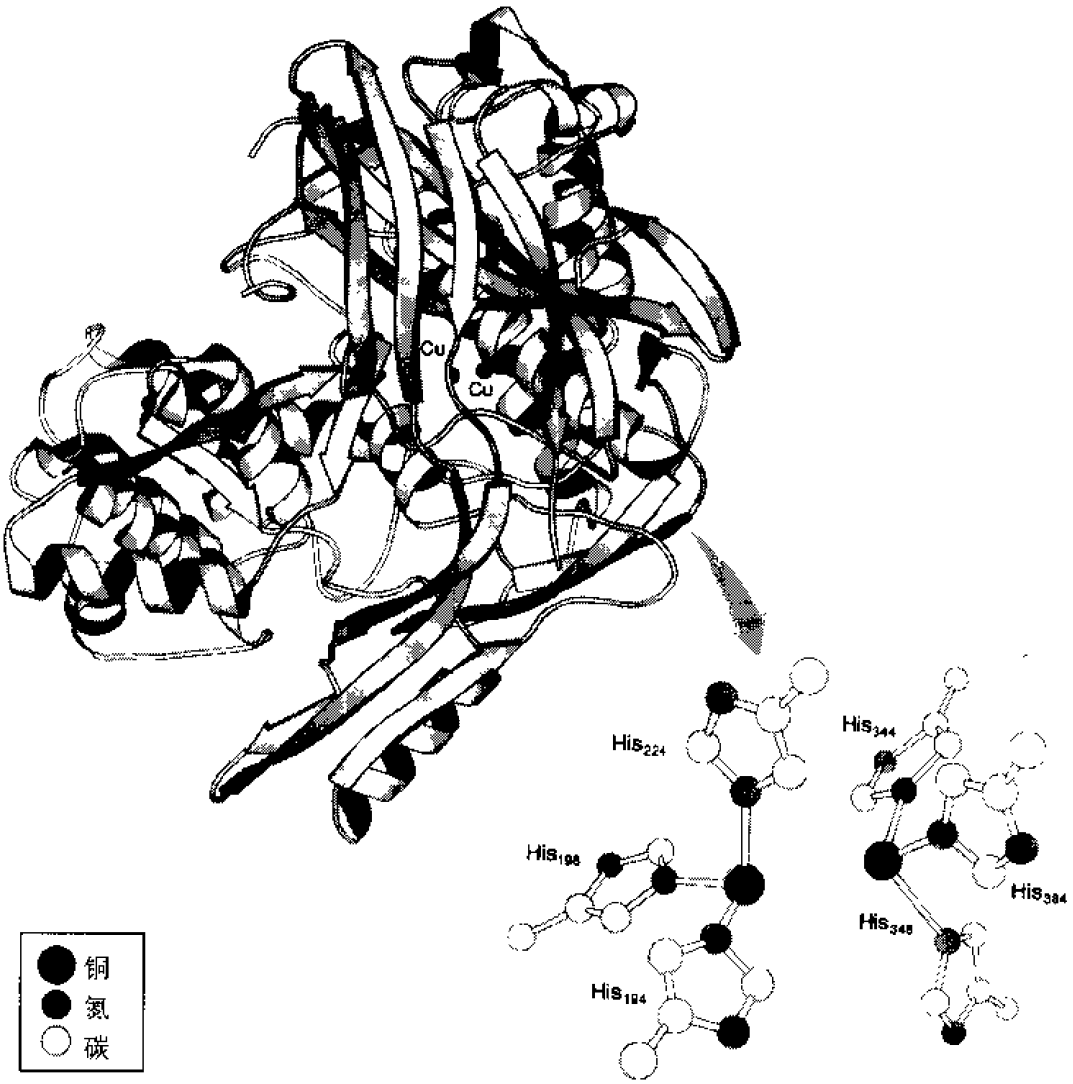


图 11.7　脱氧血蓝蛋白及其双核铜核的结构

结构，证实正是以 η^2,η^2-过氧基这种形式存在(图 11.8)的。在蛋白质的结构测定前，适宜的模型化合物已优先测定。

(iii) **模型化学和双氧结合反应**。模拟血蓝蛋白活性部位的尝试，导致发现了一些非常有意思的 Cu(Ⅱ)-双氧配合物。和 Hr 一样，在常规的氧化加成反应中，双氧加成到脱氧 Hc 的双核 Cu(Ⅰ)上，但在氧合 Hc 中，O_2^{2-} 离子和 2 个 Cu(Ⅱ)离子桥联。其中有一个模型，如上所述，结果证明为氧合 Hc 活性中心真实的复制品，它的结构示于图 11.9 的上半部分。另一个模型也示于该图中，它是在低温下，在有机溶剂中将 O_2 加成到铜(Ⅰ)配合物上，产生 $N_4Cu'—O—O—Cu'N_4$ 单元制得的。该配合物晶体的生长、固定以及 X 射线晶体学的测定均在 −98℃ 下进行，实验时的温度绝不允许升至 −30℃ 以上。尽管最终形成的(μ-过氧基)双铜(Ⅱ)配合物并不是氧合 Hc 精确的复制品，后者每个 Cu(Ⅱ)部位仅有 3 个而不是 4 个氮给体配体，然而，它的反磁性和波谱性质使 Cu'—O—O—Cu' 单元成为当时氧合 Hc 似可信的模型。

(iv) **具有 Hc-型中心的其他蛋白质**。除血蓝蛋白外，双核铜部位还存在于许多其他的金属

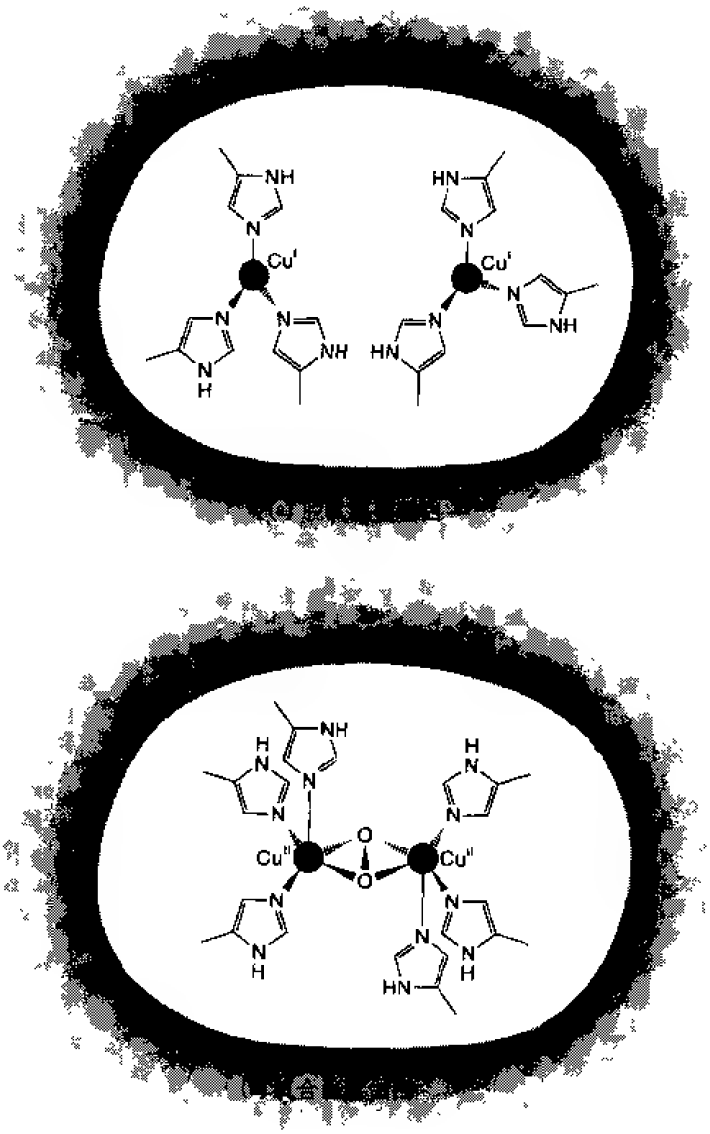
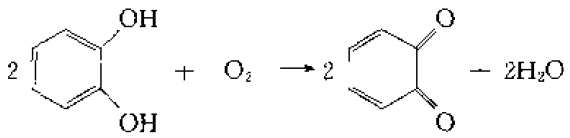


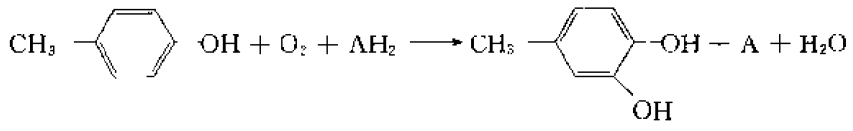
图 11.8　脱氧血蓝蛋白(a)和氧合血蓝蛋白(b)结构图

图中表示了双氧以 η^2,η^2-过氧基的形式结合

蛋白质中，其中有些在波谱学上被定义为铜类别的 3 型，而它们均与 O_2 代谢的某些方面有关。这里有特殊兴趣的是酪氨酸酶，一种哺乳动物的蛋白质，它同时具有儿茶酚酶(式 11.9)和甲苯酚酶(式 11.10)的活性。酪氨酸氧化后形成 L-多巴，继续氧化则形成皮肤黑色素。式 11.9 指出了酪氨酸酶作为一种有混合功能的氧化酶：



(11.9)



(11.10)

因此，对 Hc 和酪氨酸酶中的双核铜中心及 Hr 和 MMO 中的双核铁中心具有类似的兴趣。二者均进行可逆的双氧结合及混合功能的氧化催化作用，取决于它们所嵌入的蛋白质的环境。

近来，混合功能氧化酶（或通常称作单加氧酶）化学已在双核铜模型配合物中观测到。如同图 11.10 所示。O_2 加成到双核的铜（Ⅰ）上，结果，由于间-二甲苯基的羟基化，在两个铜的结合部位形成部分的桥联。双氧中的另一个氧原子则转变为氢氧根离子，形成一（μ-苯氧基）（μ-氢氧根）双铜（Ⅱ）配合物。应用 $^{18}O_2$ 并对产物进行质谱分析，表明这两个氧原子均进入产物。O_2 结合的简单模型化学和 Hc 及酪氨酸酶等单加氧酶活性部位的密切联系，再次证明了在生物学中，无机化学小分子对洞察金属中心功能的重要价值。

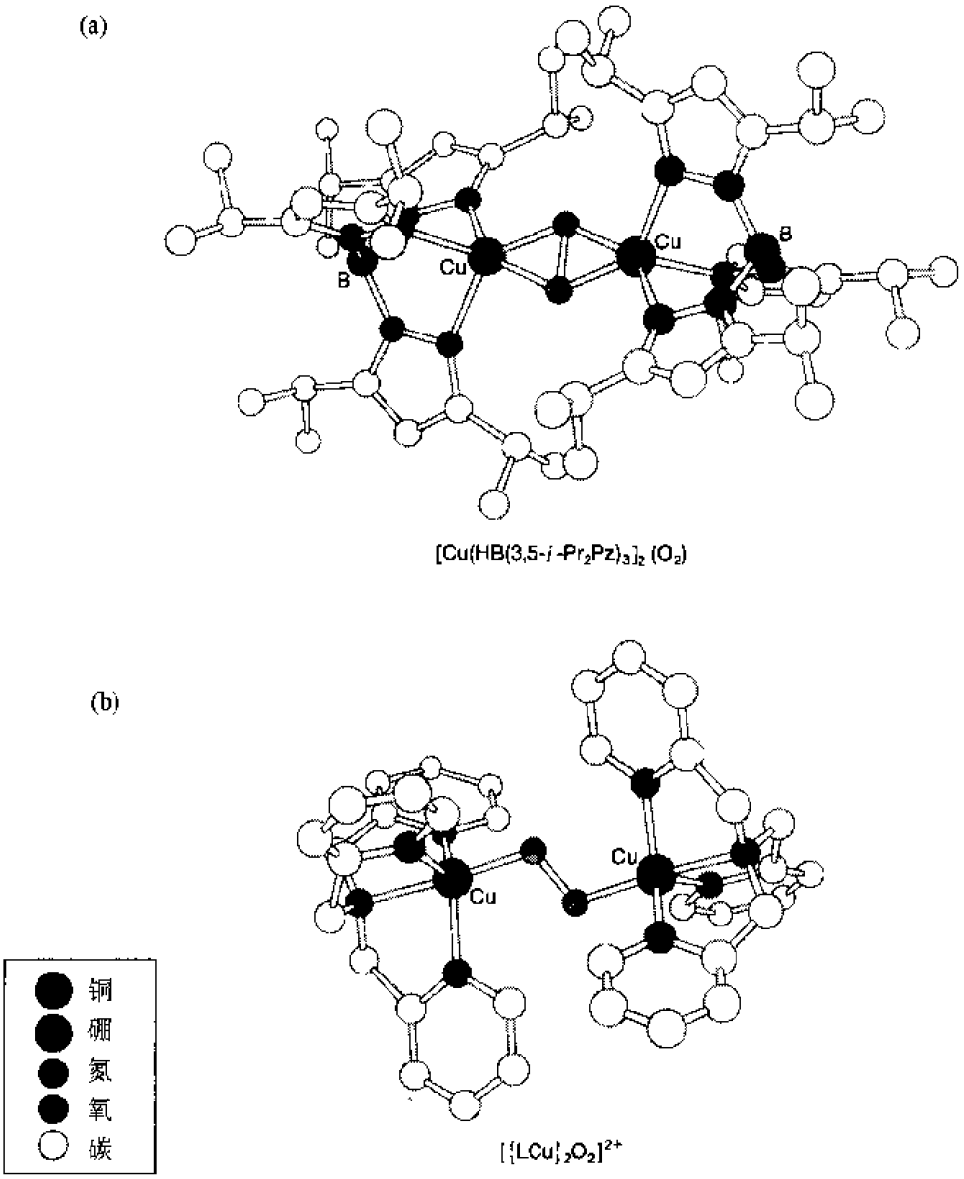


图 11.9　两个氧合血蓝蛋白的模型

一个（a）在蛋白质中存在 η^2,η^2-结构，另一个（b）存在 η^1,η^1-桥联结构

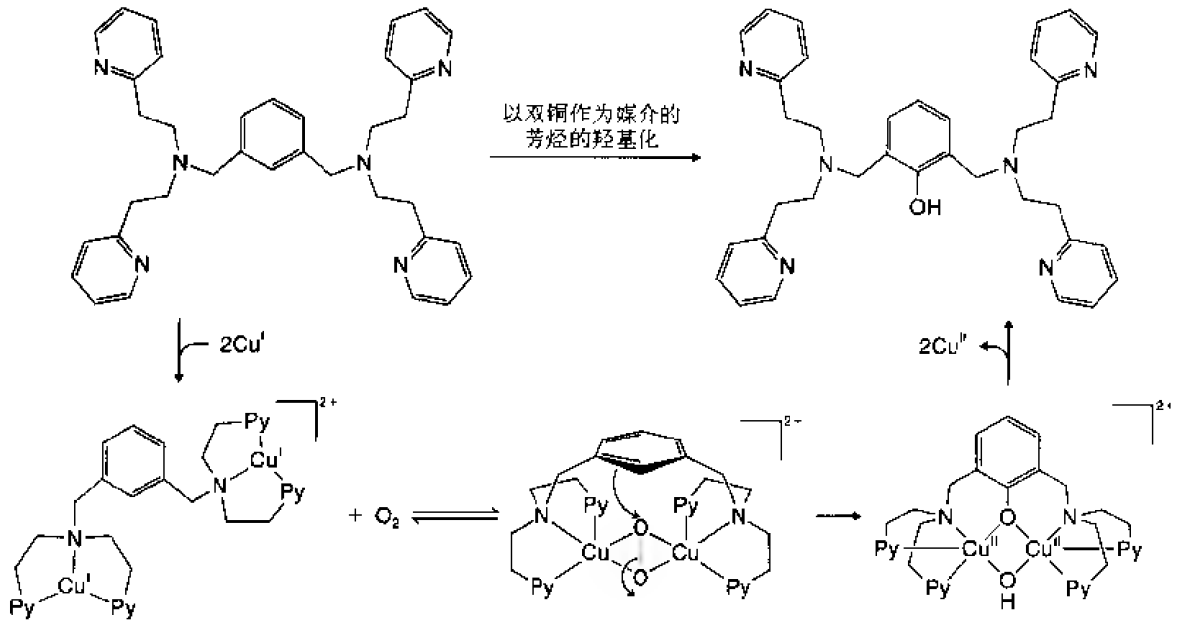


图 11.10　在合成的模型体系中观测到的单加氧酶活性

在双核铜(Ⅰ)配合物中间体,氧插入一键合配体芳香族的 C—H 键;与此同时,将铜离子氧化到铜(Ⅱ)

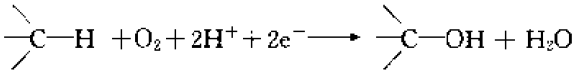
11.2　氧原子转移反应:Fe

正如第 1 章所讨论的那样,在许多被金属酶催化的化学反应中,氧原子被转移到底物的分子上。双氧是实现此类化学中最常见的反应物。在这些反应中,可分为氧原子插入 C—H 或 C—C 键两种,取决于双氧分子中究竟是两个(双加氧酶)还是仅有一个(单加氧酶)竖立在底物上。有意思的是,正像前面已注意到的,在可逆结合双氧中所用到的每一个特殊的功能中心,同样也参与了氧原子转移反应。类似于 Hr 中的双氧结合部位$\{Fe_2OH\}^{+}$和 Hc 中$\{Cu_2\}^{2+}$的双核中心分别活化甲烷单加氧酶和酪氨酸酶中的双氧,而 Hb/Mb 中的铁卟啉中心则和细胞色素 P-450 中的类似。此处我们将更详细地探讨含铁的金属酶,其中金属中心作为一活化剂,而不是可逆的双氧载体。

11.2.a　细胞色素 P-450

(i) **发现史和生物功能**。该酶首次在 1958 年从鼠肝的微粒体中分离出来。那时,用以表征金属蛋白质的物理方法远不如现在这样先进。从它的光谱性质看,该蛋白质是一种细胞色素(cytochrome),文献上称为"细胞的色素"("cellular pigment"),但该名词最终成为血红素蛋白质的同义语。亚铁-CO 衍生物在 450 nm 处的 Soret 带并无它在≈420 nm 处特征的吸收最大值,而代之以吸收带出现在 450 nm,致使它的发现者把它称为酶细胞色素 P-450。

随后的工作证明,这种膜-键合蛋白质普遍存在于从细菌到人类的各种生命形式中。虽然存在多种同功酶,但它们均催化有机底物被双氧氧化(式 11.11 和表 11.4),在生物合成、代谢、有害物的解毒,以及在有些情况下不经心产生的高活性致癌物方面均起重要的作用。



(11.11)

同样：

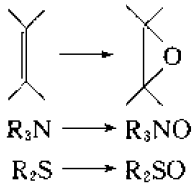


表 11.4　细胞色素 P-450 催化的主要的反应类型

反应类型	简化的实例	典型的底物
脂肪族的羟基化	环已烷 ⟶ 环已醇	戊巴比妥
芳香族的羟基化	苯 ⟶ 苯酚	苯巴比妥
烯烃环氧化	环已烯 ⟶ 氧代环已烯	氯甲桥萘
N-去烃	$CH_3N(H)CH_3 \longrightarrow CH_3NH_2 + H_2C{=}O$	美　东
O-去烃	$C_6H_5OCH_3 \longrightarrow C_6H_5OH + H_2C{=}O$	可待因
氧化脱氨基	$(CH_3)_2CHNH_2 \longrightarrow (CH_3)_2C{=}O + NH_3$	苯异丙胺
S-氧化	$CH_3SCH_3 \longrightarrow (CH_3)_2S{=}O$	氯丙嗪
还原脱卤	$C_6H_5CH_2Br \longrightarrow C_6H_5CH_3$	氟烷

(ii) **细胞色素 P-450$_{樟脑}$的结构和波谱性质**。用波谱法和模型配合物来确定细胞色素 P-450 不同氧化还原和自旋态以表征金属酶活性部位，是生物无机化学的范例。一个颇为完整和精确的图像展示在 X 射线结构报道之前。因此，我们将扼要地讨论这些结果，特别集中在从恶臭假单胞菌中来的酶上。这种可溶性的细菌酶能使樟脑(2-莰酮)羟基化，它是第一个提纯的P-450，也是第一个测定晶体结构的 P-450。

在所谓的静止态，即无底物的态，这 45 kDa 分子质量的 P-450$_{樟脑}$酶含单个低自旋的正铁血红素。作出这种表征的基础是电子自旋共振谱，它的 g 值为 2.41、2.26 和 1.91。当加入樟脑时，80%以上的蛋白质转变为高自旋态，这时的 EPR g 值为 7.8、3.9 和 1.8。在式 11.11 所示的催化循环中，电子转移到蛋白质上，形成高自旋的亚铁中间体。加入 CO，上述物种则转变为低自旋的亚铁形。因此，血红素基团四种不同的态，即 Fe(Ⅰ)和 Fe(Ⅱ)二者的高、低自旋态皆可进入细胞色素 P-450。

● 低自旋正铁态。在正铁 MbN_3^- 中，叠氮根占据着 O_2 结合部位，EPR 谱的 g 值为 2.8、2.25和 1.75，明显区别于静止态的 P-450。然而，当考察 Mb 的硫醇根配合物时，发现它的 EPR 谱和细胞色素 P-450 的更为接近(表 11.5)。上述结果，结合硫醇根修饰的无活性 P-450，强烈地指示在蛋白质中轴向的两个配体，一个是半胱氨酸的硫醇根，另一个可能是组氨酸的咪唑

表 11.5　细胞色素 P-450 的 Fe(Ⅲ)形和 Mb 衍生物的 EPR 谱数据的比较

	g_1	g_2	g_3
P 450	2.41	2.26	1.91
Mb-SH^-	2.4	2.3	1.91
Mb-SMe^-	2.38	2.25	1.94
Mb-OH	2.61	2.19	1.82
Mb-N_3^-	2.8	2.25	1.75

基。对半胱酸配体的表征，得到了铁(Ⅲ)卟啉-硫醇根配合物模型化合物的研究以及蛋白质的EXAFS结果的支持，后者测定的Fe—S键距为2.22 Å。模型化合物的研究指出，应用多种加成的轴向配体，蛋白质的波谱性质并不更改，直到至少存在一个RS^-基团。P-450$_{樟脑}$的单晶X射线结构最终证实了上述发现，揭示铁卟啉和半胱氨酸的硫配位(Fe--S 2.20 Å)，而第六个配体或是水或是氢氧根离子(图11.11)。质子NMR弛豫研究表明，轴向水配体和体相溶剂快速交换。

● 高自旋正铁态。比较正铁卟啉模型配合物和与樟脑键合的细胞色素P-450的EPR及MCD数据，强烈地指出，五配位的结构中，单个轴向配体为半胱氨酸的硫。EXAFS的研究测定，Fe-S键距为2.23 Å，接近于最终从晶体结构测定的(2.20±0.05) Å。该结构示于图11.11中。

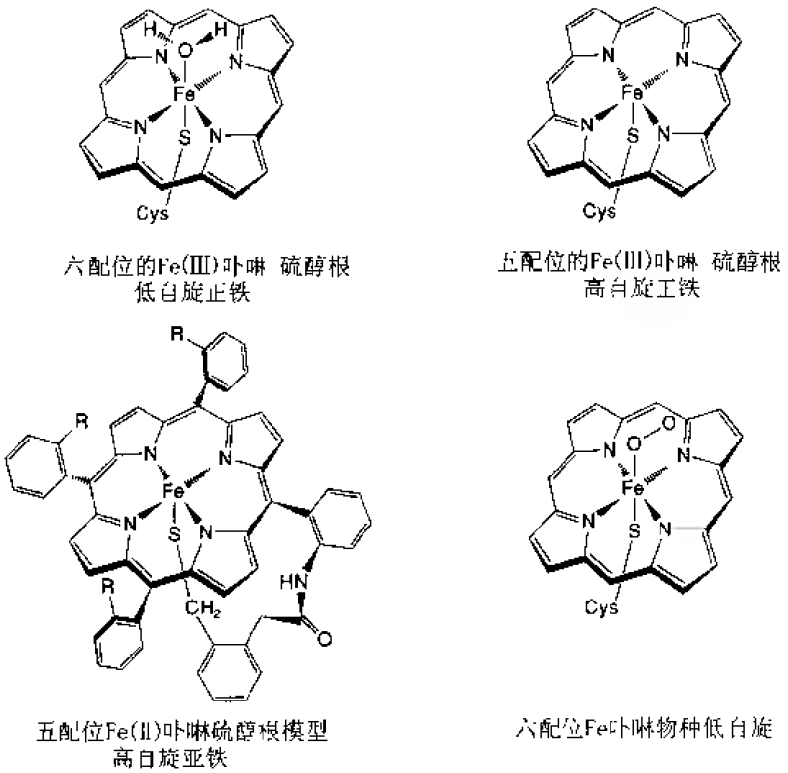


图11.11 若干铁-卟啉配合物的结构

它们或是模拟的已知中间体，或认为产生于细胞色素P 450的转换中

● 高自旋亚铁态。与樟脑键合的P-450$_{樟脑}$酶的还原，导致特征的UV-可见吸收、^{1}H MNR、MCD和EXAFS波谱的数据和高自旋的亚铁卟啉模型配合物的非常匹配，它有一单个的硫醇根轴向配体。尽管尚未获得蛋白质处于这种态的晶体结构，但是亚铁四芳基卟啉-硫醇根配合物已用晶体法表征，它可被视为该酶在这种态时结构接近的类似物(图11.11)。

● 低自旋亚铁态。低自旋的CO和亚铁键合形成的细胞色素P-450，所给出的不同的450 nm Soret带，含轴向的硫醇根和一氧化碳配体。广延UV-可见光谱、穆斯鲍尔谱、MCD、^{13}C NMR对^{13}CO-键合的蛋白质，及酶和模型配合物的EXAFS数据，最终证实了上述结构。和Mb一样，也能合成出亚铁P-450反磁性的双氧衍生物。共振拉曼光谱证实了O—O伸缩频率发生在1140 cm^{-1}处，与常规的$Fe^{Ⅱ}$ O_2^-电子结构的表征相一致。该配合物的结构，正如

EXAFS所证实的类似于模型配合物，它和其他各种态一起示于图 11.11 中。该结构现已被 X 射线晶体学所证实。

(iii) **催化循环**。图 11.12 表示了现已接受的细胞色素 P-450 氧化碳氢化物的机理。该机理是由广延^{18}O-标记实验、羟基化反应的区域选择性演绎而来，其他信息大多从研究肝微粒体

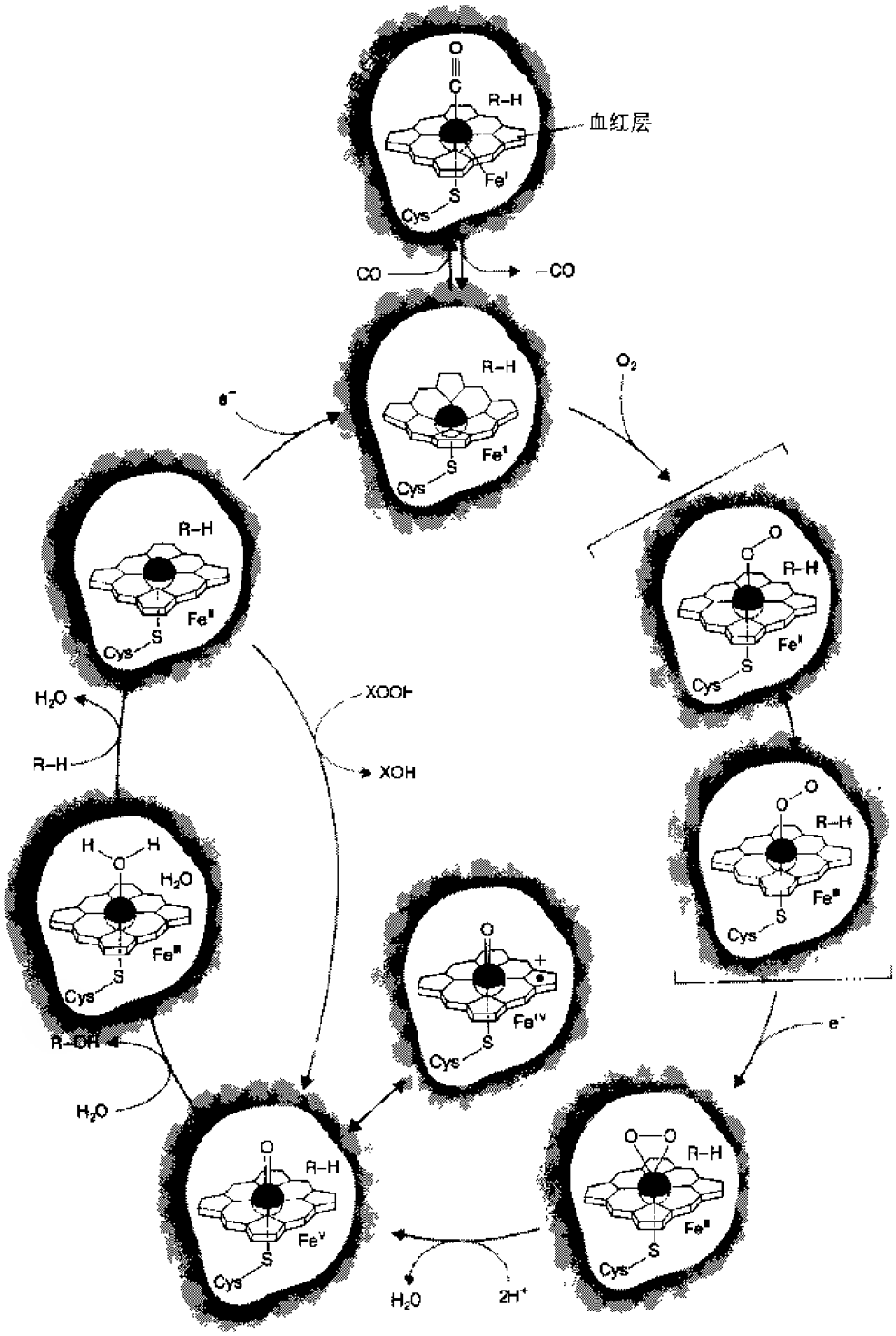


图 11.12　建议的细胞色素 P-450 的催化机理

过氧化物旁路表示出由 XOOH 到 XOH

(LM)和 P-450$_{樟脑}$酶而来。在上述体系中,电子(e^-)由 NADPH 提供,并和还原酶及假单胞氧还蛋白体系的偶合作用有关(图 11.13)。在酶机理的第一步,底物结合,并将 Fe(Ⅲ)中心由低自旋 6-配位转变为高自旋 5-配位的正铁态。X 射线对细胞色素 P-450$_{樟脑}$和樟脑(CAM)加合物的研究,揭示底物结合在蛋白质疏水性的区域,接近血红素铁中心,并将所有存在于底物结合口袋中的水分子驱赶出去。在底物结合中,多肽骨架或侧链的原子只有极少许重排。有意思的是,键合底物的存在,使 P-450$_{樟脑}$氧化还原电位从−300 mV 位移至−173 mV,使它更易还原。

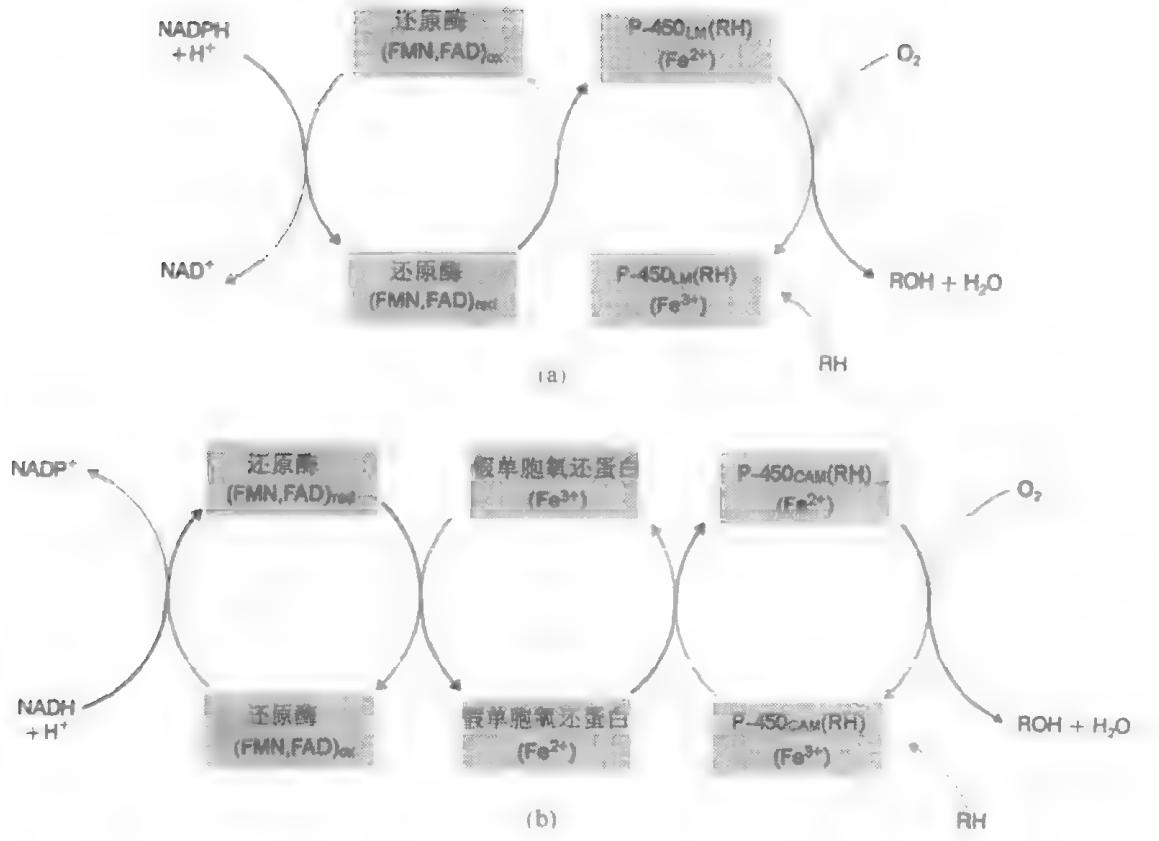


图 11.13　细胞色素 P-450 羟基化底物的电子转移图

(a) 在肝微粒体(LM)中;　(b)在细菌体系的樟脑(CAM)中

(上述两种情况下,电子转移过程中和其他蛋白质的偶合也一并示于图中)

催化循环(图 11.12)的第二步是加合一电子形成高自旋的亚铁底物键合酶,蛋白质对氧结合步是最重要的,它导致亚铁双氧(或正铁超氧,见上述)中间体被分离出来并加以表征。假设的反应机理的下一步是引入第二个还原等当量物,这一步并未在任何 P-450 酶中直接观测到。在形式上,该中间体可书写为未知质子化态的正铁过氧配合物。

上述循环现已进行到关键的中间体的形式,而对这几步的反应甚至了解更少。重要的是,在加入质子后,O—O 键断裂产生水,结果,有一氧原子的形式氧化态为零,而铁中心的形式氧化水平为+3。上述双原子单元可书写为 $Fe^{Ⅲ}—O^0 \longleftrightarrow Fe^{Ⅳ}—O^- \longleftrightarrow Fe^{Ⅴ}—O^{2-}$,称之为"oxenoid"部分。而且,卟啉环的 π-体系本身可被氧化到阳离子自由基,如 $PFe^{Ⅴ}—O^{2-}$ 或 $PFe^{Ⅴ}═O$ 的氧合形,其中 P 代表卟啉,也可换一种方式,写成 $P \cdot Fe^{Ⅳ}═O$,其中"P ·"代表卟啉自由基阳离子。

PFe═O "oxenoid"物种和碳氢化合物底物反应产生醇和静止蛋白质，这在生物无机化学中是让人最感兴趣的转换之一。事实上，樟脑、降冰片烷和其他饱和碳氢化合物发生部分差向立体异构，而在底物，如外，外，外，外-四氘降冰片烷中观测到大的氘同位素效应，强烈地建议这样一种机理，即 C—H 键为均裂。反应伴随着极快的 Fe—OH 单元的重组，给出的产物示于式 11.12 中：

$$R{-}H + Fe^{V}{=}O \longrightarrow [R\cdot + Fe^{IV}{-}OH] \longrightarrow ROH + Fe^{II} \qquad (11.12)$$

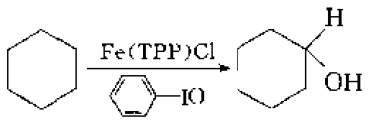
这些假设的步骤称为"重键合机理"(rebound mechanism)。自由基重组步的估计值为$\approx 10^{9}$ s^{-1}，快到某些自由基来不及完成其重排，例如，环丙基甲基自由基的 $k \approx 10^{8}\ s^{-1}$。R—H 的异裂或协同加成到 $Fe^{V}{=}O$ 键似乎不大像，但也不能完全排除。

催化循环(图 11.12)的最后一步是离解作用，产生 ROH。推测醇在释放到溶液之前，短暂的配位到正铁卟啉的部位。该物种具有低的还原电位，类似于其他低自旋的 Fe^{II}P-450 中心，它倾向于防止加入更多的电子而在下一轮的氧化中形成二醇。此外，似乎这种和醇配体的键合能在与另一个底物分子配合之前便已脱离铁中心。

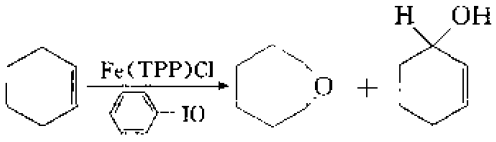
尽管还不能确切地了解催化循环的哪一步是速控步，但似乎是加入第二个电子或随后这两步中的一步。正如图 11.12 指出的那样，循环中还原和 O_2-结合步可由加入过氧化物 XOOH 到含键合底物的 P-450 酶旁路进行。该反应被称为"过氧化物旁路"(peroxide shunt)，立即到假设的 oxenoid 中间体和随后的烷烃氧化化学。

(iv) **细胞色素 P-450 化学的模型**。图 11.12 所表示的细胞色素 P-450 的反应机理中，某些最令人信服的证据是由合成模型的研究中来的。在一条路线的工作中，用到了 5,10,15,20-四苯基卟啉基铁(Ⅲ)配合物。分子中卟啉环平面上方和下方的甲基基团，对形成(μ-氧)双铁(Ⅲ)物种提供了一道立体化学的屏障。类似于 P-450 化学中的过氧化物旁路，该金属卟啉能与过氧酸反应，如对-硝基过苯甲酸或亚碘酰苯(PhIO)，一个已知的氧转移剂，形成一不稳定的绿色物种，便于进行碳氢化物的氧化。该绿色铁-卟啉-氧合配合物在低温下，足以进行 EXAFS 和穆斯鲍尔谱的研究。前者测定的 Fe═O 键距为1.6 Å，后者的结果可合理地解释为有一 $S=1$ 的 Fe(Ⅳ)中心，它和卟啉阳离子自由基呈强烈的铁磁性偶合。该物种在 ^{1}H NMR 谱中大的低场位移(间位质子 $\delta \approx 70$ ppm)，反映了卟啉环自由基阳离子的特征。

由于应用了氧转移剂和简单的铁卟啉，使细胞色素 P-450 的碳氢化物氧化化学得以成功地再现。用氯化四苯基卟啉铁(Ⅲ)和亚碘酰苯模拟P-450 的反应，再现了环己烷氧化到环己醇(式 11.13)，或环己烯氧化到环氧化物和烯丙基醇(式 11.14)的反应。



(11.13)



(11.14)

11.2.b 甲烷单加氧酶

(i) **MMO 的三种蛋白质**。甲烷是碳氢化合物底物中最难羟基化的一个，它的 C—H 键能高(104 kcal/mol)，无偶极矩，又无功能团协助结合或与蛋白质活性部位反应。细胞色素 P-450

不能使甲烷羟基化。因此，细菌对甲烷感兴趣，并把它作为惟一的碳和能量的来源。第一例由亚甲基营养的细菌所催化的反应即为甲烷的羟基化，而所用到的酶体系为甲烷单加氧酶(methane monooxygenase)。由 methylococcus capsulatus(Bath)而来的 MMO[该生物体由英格兰巴思(Bath)的温泉水中分离出来]含三种蛋白质(图 11.14)，即羟化酶(早先称作蛋白质 A)、还原酶(蛋白质 C)和一种普通的或偶合的蛋白质 B，在某种意义上，它调节蛋白质 A 和 C 之间的电子转换。正如图11.14所示，电子通过铁-硫核和还原酶蛋白中的黄素辅因子进入体系。然后，在偶合蛋白质的帮助下，电子转移到羟化酶上，这是底物结合和双氧的活性部位。这种格局能保证还原剂 NADH 始终不直接和酶循环中产生的高活性羟基化单元接触。类似的措施也用于细胞色素 P-450 酶体系中(见图 11.13)。此外，有迹象表明，只有在底物键合以后，电子才可能转移到 MMO 羟化酶上，而且在这种情况下，同时转移 2 个电子。电子转移的控制受蛋白质偶合的影响，以防止在无底物存在下，氧化破坏羟化酶和白白消耗等当量的还原物。这些控制措施都是模拟细胞色素 P-450 体系所采用过的办法。

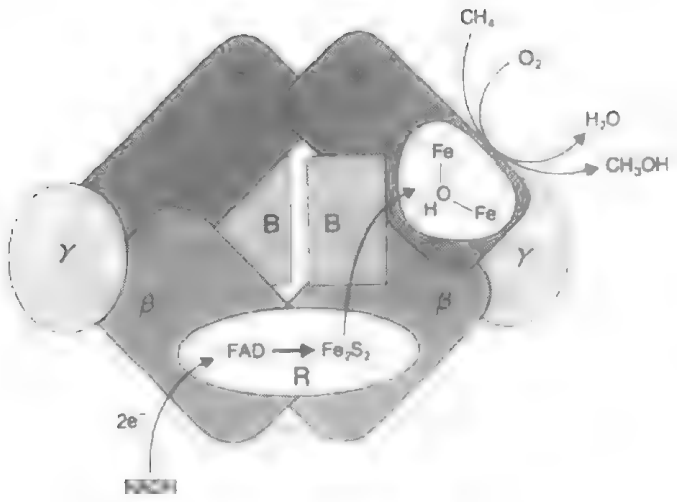


图 11.14　甲烷单加氧酶的 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ 羟化酶(H)蛋白质以及酶活性所必需的偶合(B)和还原酶(R)蛋白质图示

电子转移发生在从 NADH 通过还原酶到羟化酶 α 亚基的双核铁中心

(H 的 α、β、γ-亚基的相应位置根据最近由 X 射线晶体学的测定结果绘出)

(ii) **羟化酶蛋白质中双核铁核的结构和化学反应性。**MMO 羟化酶(hydroxylase)蛋白质的活性部位含一双核非血红素铁单元。正如 EXAFS 研究所指出的那样，Fe…Fe距离≈3.4～3.5 Å，至少在三种氧化还原形，即 Fe(Ⅲ)Fe(Ⅲ)、Fe(Ⅱ)Fe(Ⅱ)、Fe(Ⅱ)Fe(Ⅱ)中的前两种是如此。其中无短的 μ-氧键，同时，两个铁原子有 5 个或 6 个氧或氮给体原子。从最大功率 EPR 谱对混合价态的研究来看，2 个铁原子互呈反铁磁性偶合，自旋交换偶合常数 $J=-30\ cm^{-1}$。最近，用质子 ENDOR 对这种形式的测定，强有力地提供了存在羟基桥的证据。MMO 羟化酶的 α-亚基和核苷酸还原酶的 R2 蛋白质间有某些相似性，最近 X 射线结构研究表明，其中存在双核铁核，如图 11.15 所示。该报道指出，MMO 羟化酶中的双铁核很像是被一个或两个羧基桥联，如同从氢氧根离子中来的单个氧原子那样。ENDOR 和 ESEEM 的研究证实两个铁原子均有组氨酸与之配位。上述这两点结论最近均为 X 射线晶体学所证实。

如前所述，MMO 中的双核铁中心具有催化氧化的混合功能，类似于细胞色素 P-450。但

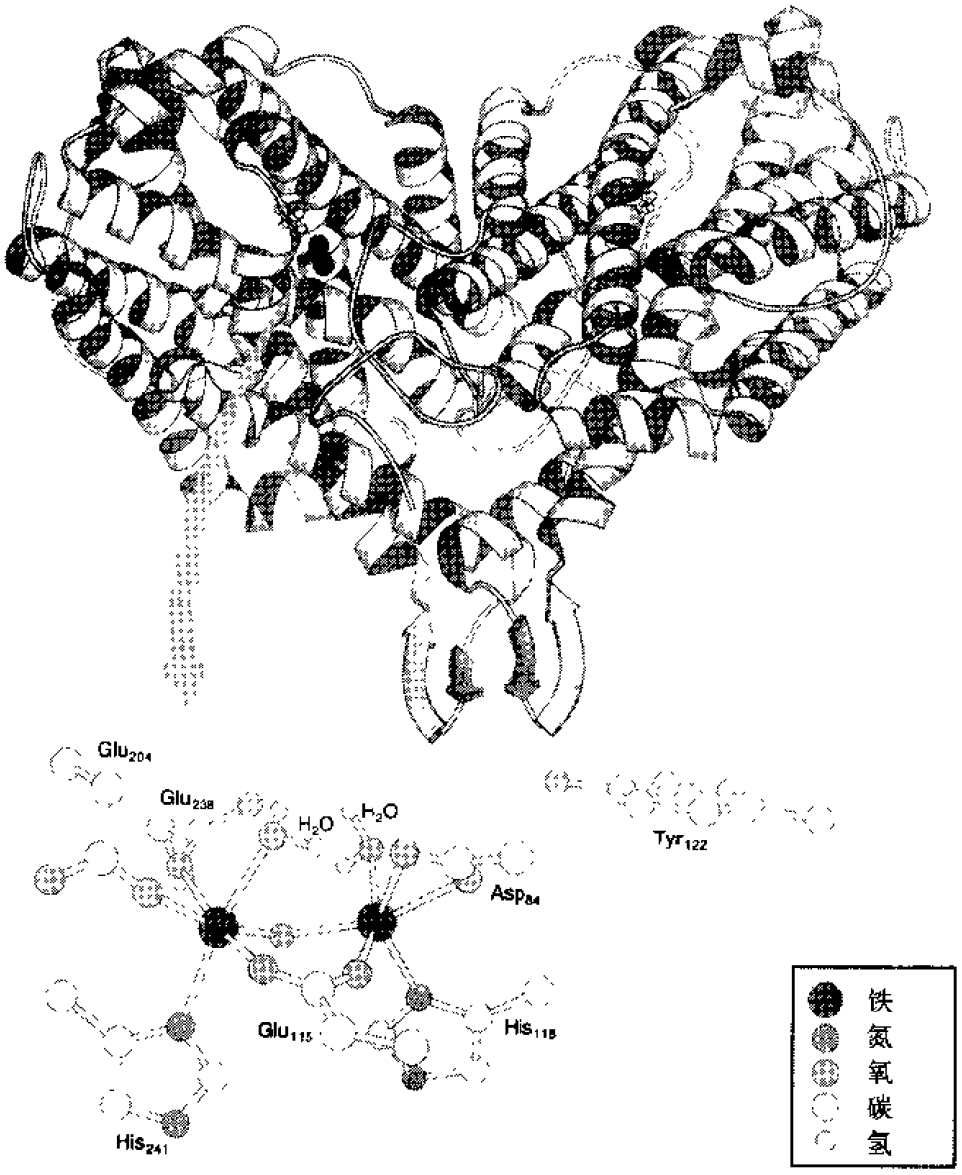


图 11.15　细菌核苷酸还原酶的 R2 蛋白质结构

图中表示出双核铁中心和附近的酪氨酸自由基

详细的反应机理却了解得少得多，尽管单个的循环实验已经建立，其中还原蛋白质与双氧和烷烃底物反应，产生相应的醇。阐明最近探测到的化学中间体的结构，发展适宜的模型体系，仍是生物无机化学面临的重要挑战。值得深思的是，在甲烷的氧化中，大自然选择了 MMO 中的双金属铁中心与单核的铁卟啉辅基相类比，因为在这两个体系中，两电子得以转移而不产生高价的铁(Ⅴ)物种。正如式 11.15a 和 11.15b 所示，双铁(Ⅱ)在电子上等价于 $PFe^{Ⅱ}$ 中心：

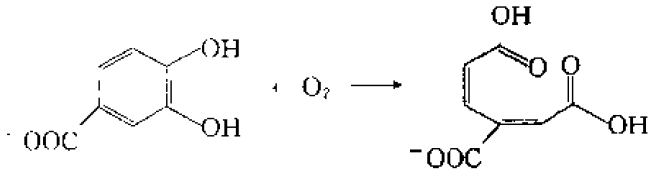
$$PFe^{Ⅱ}+O_2H^- \xrightarrow{H_2O} PFe^{Ⅴ}=O \longleftrightarrow \cdot PFe^{Ⅳ}=O \qquad (11.15a)$$

$$Fe_2^{Ⅱ}+O_2H^- \xrightarrow{H_2O} Fe_2^{Ⅳ}=O \qquad (11.15b)$$

另一方面，企图证明类似于式 11.12 的自由基中间体的存在仍有分歧，同时需要澄清 MMO 和细胞色素 P-450 体系间有着重要的差异。最近，羟化酶蛋白质的晶体结构已用分辨为2.2 Å的 X 射线进行了测定。结果发现活性部位与 R2 蛋白质类似(图 11.15)，其中有一疏水性口袋以结合底物。这些不断发展的研究成果，将极有助于阐明酶机理的细节。

11.2.c 儿茶酚和其他双加氧酶

细胞色素 P-450 和 MMO 二者均为混合功能氧化酶，且仅有一个双氧的原子转移到烷烃上，另一个则转化为水。该过程在形成等当量还原物时需要能量。双加氧酶则不同，它将 O_2 分子中的两个原子都结合到底物上。在这一类酶中，表征得最好的是原儿茶酸根 3,4-双加氧酶 (protocatechuate 3,4-dioxygenase)，它催化的反应如式 11.16 所示：



(11.16)

这种转化含芳香环的断裂并形成二羧酸。从标记研究测得，每个羧基都含有一个从双氧底物中来的氧原子。

由于从酪氨酸根配体到 Fe(Ⅲ)离子活性部位的电荷转移，使该酶一般呈红色。由 *Pseudo-*

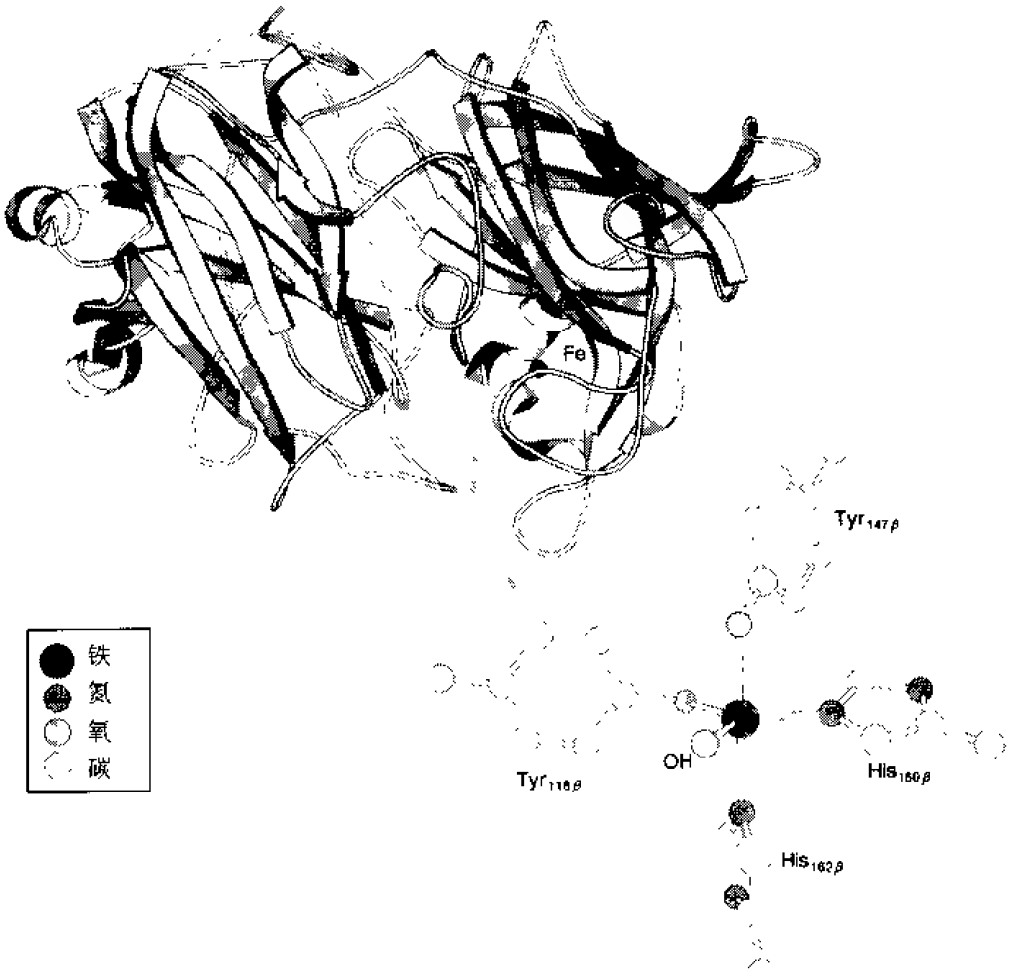


图 11.16 原儿茶酸根 3,4-双加氧酶的结构及其铁中心

monas aeroginosa 而来的原儿茶酸根 3,4-双加氧酶的晶体结构已测定,分辨率到2.8 Å。该酶是一个大的低聚物,两条亚基中的每一条都有 12 段复制段,α 亚基为 22 kDa,β 亚基为 27 kDa,总的对称性为 T。酶的活性部位位于 α 和 β 亚基间的界面上,尽管所有铁的配体均来自 β 亚基。活性部位的结构示于图 11.16 中。配体为酪氨酸-118、酪氨酸-147、组氨酸-160 和组氨酸-162,还有一个键合的溶剂分子,或者是水或者是氢氧根离子。

基于广泛的动力学和变换底物的研究,提出了该酶合理的详细机理图解,示于图 11.17 中。该机理的关键特征是,在金属中心和配位的儿茶酚基之间存在明显的电荷转移。这种从配体到铁中心的电子转移,赋予配体显著的半醌类自由基特性,并使之活化以直接和双氧分子接触。然后,配体-双氧加合物进行一系列的转变,最终形成产物。

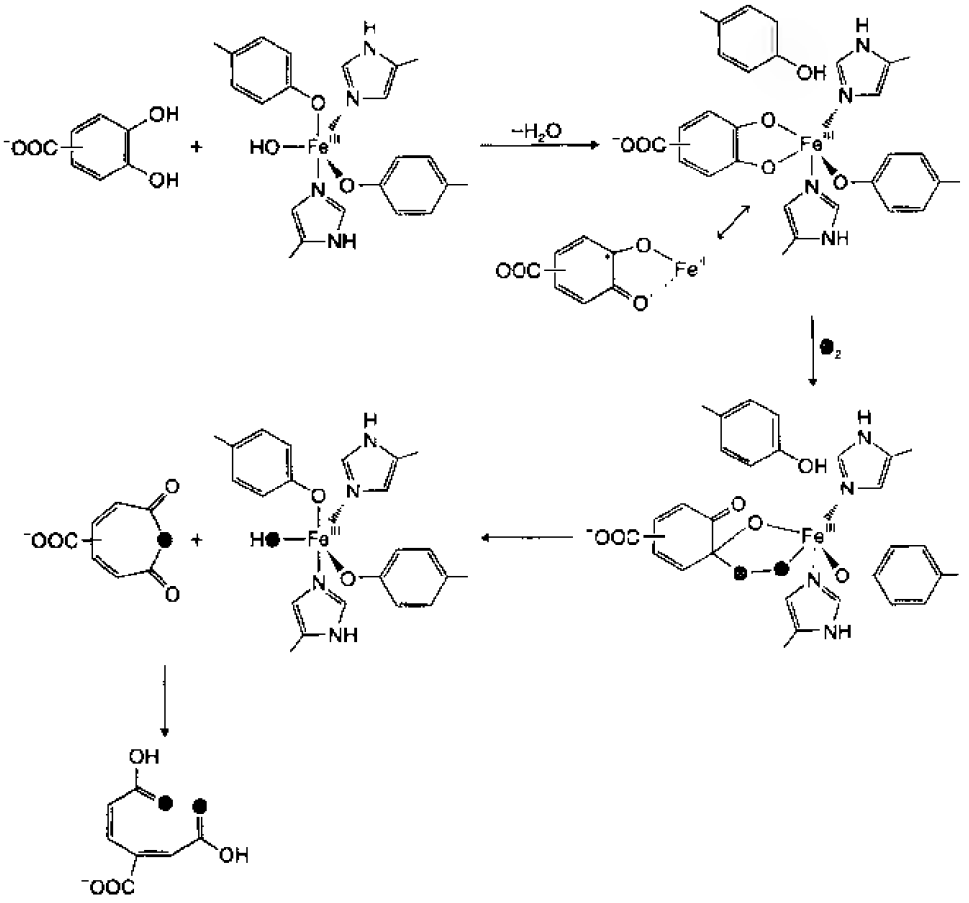


图 11.17　建议的原儿茶酸根 3,4-双加氧酶的作用机理

黑色的原子表示引入^{18}O 标记双氧后替代的氧原子

上述机理的某些方面已用实验探测。特别是对从暗褐短杆菌来的酶的 EXAFS 研究已经开展。静态 EXAFS 谱与晶体结构的结果一致,揭示了 3 个氧或氮配体在 1.90 Å 以及 2 个 O/N在2.08 Å 处。其中较短的距离表征为 2 个酪氨酸根配体及一个键合的氢氧根离子;较长的距离则为 2 个组氨酸。加入儿茶酚基底物,它通过 2 个羟基和铁配位,这是从一系列 EPR 的研究推断的,这个结果和 EXAFS 曲线拟合得到的参数几乎没有多大差别。上述结果表明,铁仍为五配位,这个结论要求原来存在于静止酶中的两个配体被取代。显然,氢氧根离子是一个候选者,且随即被酚的一个氢原子质子化。与此同时,又提出一个组氨酸或酪氨酸根配体被取

代，并被留下的酚的氢原子质子化。总的变化概括在图 11.17 中。氧的插入和断裂反应的某些细节还有待于确切地阐明。

双加氧酶中的铁结合并活化底物，通过从底物到金属中心的部分电荷转移，有利于双氧的亲电进攻。这种作用可与第 10 章所讨论的酶的金属离子相对照，它的作用如 Lewis 酸。一个完全氧化还原惰性的金属离子如锌，也许不可能代替铁(Ⅱ)的功能。但有兴趣看一看这种需要氧化还原特性的程度，能否应用到其他的双加氧酶体系上。

11.3 氧原子转移反应：Mo

11.3.a 钼氧转移酶

另一大类促进氧原子转移反应的酶就是那些含钼的酶。除固氮酶外，所有含钼的酶看来都需要一个共同的辅因子，近年来已阐明了它可能的结构(见 5.4.d 节和图 5.20)。波谱研究，特别是 EPR 和 X 射线吸收光谱的研究，揭示了钼部位的详细性质，并表明它们在不同的酶中显著地不同，在某种意义上类似于在含卟啉的蛋白质中所见到的那样。然而，对于钼蛋白，这种变化似乎更大。这些酶均能催化反应，其中能书写为氧原子转移反应的列于表 11.6 中。这些酶享有一共同辅因子，强有力的证明来自 *Neurospora crassa* 上壤试样的突变体。这种生物体通常产生硝酸盐还原酶，但为一种扭曲的突变体，无活性，称作 nit-1。用酸钝化的硝酸盐还原酶萃取处理 nit-1，能恢复硝酸盐还原酶潜在的活性。重要的是，萃取所有其他已知的钼酶(除固氮酶外)，都能和萃取 nit-1 那样进行活化。

表 11.6 含钼的氧转移酶

酶	催化的反应
黄嘌呤氧化酶	黄嘌呤 $+H_2O \longrightarrow$ 尿酸 $+2H^+ +2e^-$
亚硫酸盐氧化酶	$SO_3^{2-}+H_2O \longrightarrow SO_4^{2-}+2H^+ +2e$
硝酸盐还原酶	$NO_3^- +2H^+ -2e \longrightarrow NO_2^- +H_2O$
甲酸脱氢酶	$HCOOH \longrightarrow CO_2+2e^- -2H^+$
CO 脱氢酶	$CO+H_2O \longrightarrow CO_2+2e^- -2H^+$
二甲亚砜脱氢酶	$2e \quad -2H \mid (CH_3)_2SO \longrightarrow H_2O+(CH_3)_2S$
二甲胺 N-氧化物还原酶	$(CH_3)_3NO+2e^- +2H^+ \longrightarrow (CH_3)_3N+H_2O$
生物素亚砜还原酶	生物素亚砜 $+2e^- +2H^+ \longrightarrow$ 生物素 $+H_2O$

此处我们将集中讨论两种酶，即黄嘌呤氧化酶和亚硫酸盐氧化酶。由牛奶中分离得到的黄嘌呤氧化酶是研究得较多的一个酶。它以二聚体的形式存在，分子质量≈300 kDa。每条亚基含 1 个钼、1 个黄素腺嘌呤双核苷酸和 2 个 Fe_2S_2 中心。黄嘌呤氧化酶及密切相关的从肝中提取的黄嘌呤脱氢酶中，钼部位某些方面的结构已由 EXAFS 研究测定。其氧化形有一端梢的钼氧基(Mo═O)，至少有两个硫醇基型的硫配体(可能由蝶呤二硫戊环烯侧链而来)及一个端梢的硫基(Mo═S)。一系列的化学研究预示了由波谱法对上述硫基的发现。用 CN^- 处理黄嘌呤氧化酶，使酶丧失活性并释放出等量的硫氰根离子 SCN^-。还原形仍有一端梢的氧基，但端梢的硫基似乎质子化形成硫氢根(SH^-)配体。用氰化物处理的酶，在氧化形中有 2 个端梢的氧基。

曾报道了一则和黄嘌呤氧化酶机理密切相关的关键性实验。还原形黄嘌呤氧化酶被 ^{18}O

标记的氧化胺衍生物氧化，然后，加入低于化学计量的黄嘌呤。分离得到的尿酸至少含 79%的标记氧。相反，用含^{18}O 的水和未标记的酶进行实验，结果只有少许标记物进入产物。上述结果表明，酶催化的反应是通过转移一个氧原子或它的等当量物到底物，而不是由钼促进溶剂水或氢氧根的进攻进行的。

黄嘌呤氧化酶中的 Mo(Ⅴ)形式曾通过一系列 EPR 谱进行过观测，实验中运用速冻法来制备试样。由于在催化循环中，钼中心在 Mo(Ⅵ)和 Mo(Ⅳ)氧化还原态间来回变化，因此，该物种给出的 EPR 信号和主要的反应路径间的相互关系还不甚清楚。因为该酶还含其他的氧化还原活性中心，而反应过程中产生的 Mo(Ⅳ)物种又能与 EPR 活性的 Mo(Ⅴ)物种通过分子内的电子转移反应处于平衡。此外，Mo(Ⅴ)也能在酶再氧化到 Mo(Ⅵ)态的过程中产生。因此，EPR 研究极难提供有关反应机理和重要中间产物结构的信息。一种可能的机理图解示于图 11.18 中。其中一个氧原子由钼中心转移到黄嘌呤，端梢键合的硫基对从底物迁移来的氢的作用好似一个碱基。然后，从水分子通过一系列去质子偶合和电子转移步而来的氧又重新和 Mo 中心结合。

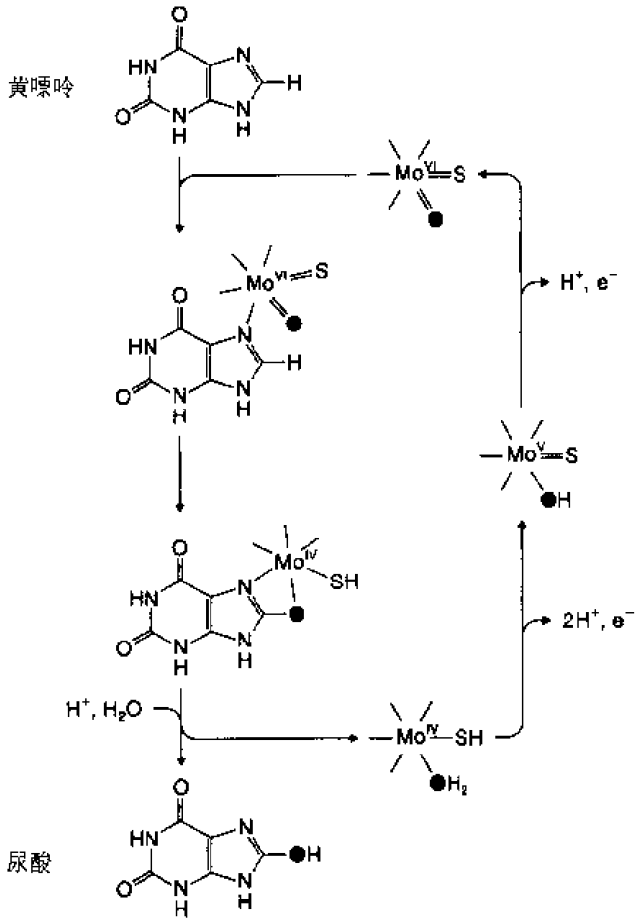


图 11.18　黄嘌呤在黄嘌呤氧化酶的钼部位转化为尿酸的建议机理

亚硫酸盐氧化酶比起黄嘌呤氧化酶来较为简单，除由钼辅因子衍生而来的中心外，仅含一单个的辅基，即血红素。此外，从鸡肝中提取的酶中，两个辅基彼此分立，且仅有少许蛋白水解。因此，全酶是二聚体，分子质量为 120 kDa。用胰蛋白酶处理，产生两 9.5 kDa 等量的单体碎

片，含血红素基团；一个 94 kDa 的二聚体单元，含钼中心。上述两种碎片总的分子量小于全酶的事实，反映了实验测定蛋白质分子量上的误差。在这个意义上，使酶断裂的技能可将两个半反应分开，以便更好地进行钼中心的波谱表征，免受其他强吸收物种的干扰。特别是当保持原样的酶，能以氧化形细胞色素 c、铁氰酸盐或双氧作电子受体来氧化亚硫酸盐时，分离的钼域便失去了将电子转移到细胞色素 c 上的能力，但对其他试剂仍保持着它的活性。上述观测表明，亚硫酸盐的氧化作用发生在钼中心，在上述两电子氧化中，血红素中心对两分子细胞色素 c 的还原起偶合作用。

和黄嘌呤氧化酶一样，许多关于亚硫酸盐氧化酶中钼部位的结构信息均来自 EXAFS 研究。该酶的氧化形有 2 个端梢的氧基和 2 个或 3 个硫醇根的硫原子。在还原作用下，失去一个氧基，而硫醇根硫原子的数目则可更可靠地表征为 3 个。顺-二氧钼(Ⅵ)单元在钼的化学中颇为寻常。该物种和硫醇根的硫配位，已知能和氧基受体如膦进行氧原子转移反应。基于上述化学观测，加上对酶的动力学研究，提出了如图 11.19 所示的催化循环。底物的氧化作用通过从钼到亚硫酸盐直接的氧原子转移形成硫酸盐进行。然后，单氧钼(Ⅳ)物种在两个单电子步并与 ·键合水分子的脱质子偶合又重新被氧化。

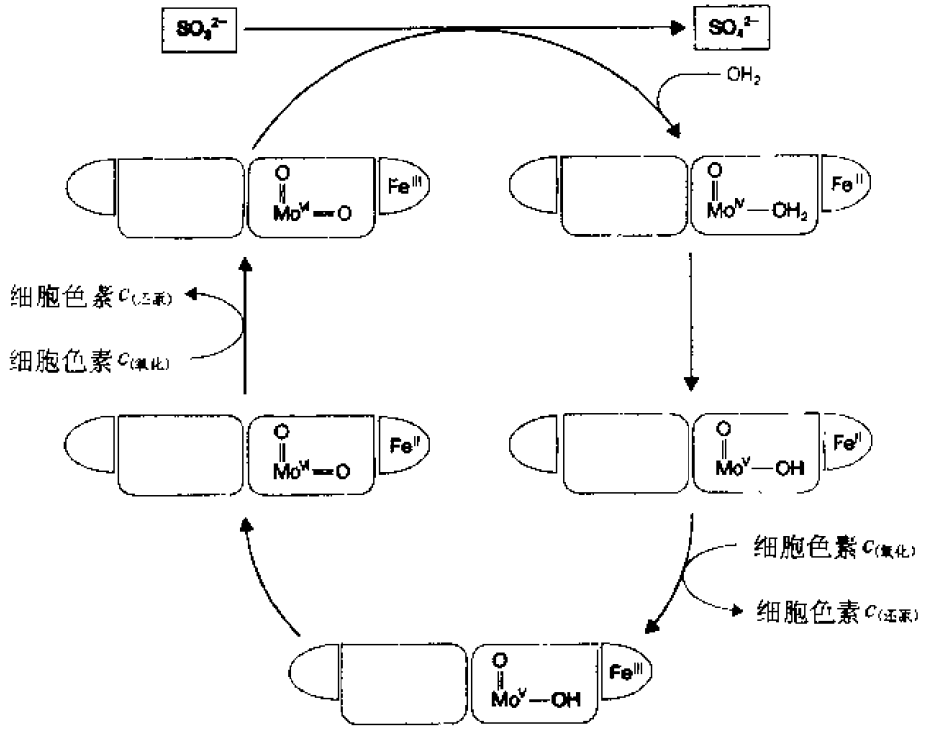


图 11.19　假设的亚硫酸盐被亚硫酸盐氧化酶转化为硫酸盐的机理图示

图中示出了氧原子的转移和其中的电子转移步

上述两例证实了氧钼中心在实施氧原子转移反应中的作用。稳定的 Mo(Ⅵ)和 Mo(Ⅳ)氧化水平和一定数目端接的配体有利于这类反应的进行，而不产生底物的自由基物种。特殊的蝶呤作为钼的配体之一，在这些中心的作用尚属未知。也可能包含在到底物的电子转移过程中，尽管目前尚无数据表明需要这种功能。更大的可能性是，它能改善电子转移的路径，因为在这类酶中几乎永远存在以钼为中心的反应和其他具有氧化还原活性基团间的偶合。

11.3.b 钼氧转移酶的模型

已经合成了若干钼氧转移酶活性部位的模型配合物。这些模型一般都不是去再现酶中发现的蝶呤部分，尽管 EXAFS 分析表明，它们的确在某种程度上近似于和钼键合的给体原子。最重要的是，它有可能模拟酶的活性，特别是氧原子转移步。在这一类反应中，研究得最多的包括将亚砜还原到硫化物和将氧化胺还原到胺。

最广泛表征的体系用到了如下所示的吡啶-硫醇根配体 L。已制备出化学式为$[MoO_2(L)_2]$的配合物，其中含双氧合钼(Ⅵ)部分，它的结构示于图 11.20 中。该配合物和膦，如 Et_3P 反应，结果，氧原子从钼转移到磷上，并产生相应的氧化膦和氧合钼(Ⅳ)配合物$[MoO(L)_2]$，它的结构一并示于图11.20中。注意，庞大的叔-丁基结合到配体中能妨碍$[MoO_2(L_2)]$和$[MoO(L)_2]$间的反应，该反应能产生 Mo(Ⅴ)氧桥配合物$[(L)_2MoOMo(L)_2]$。很大程度上

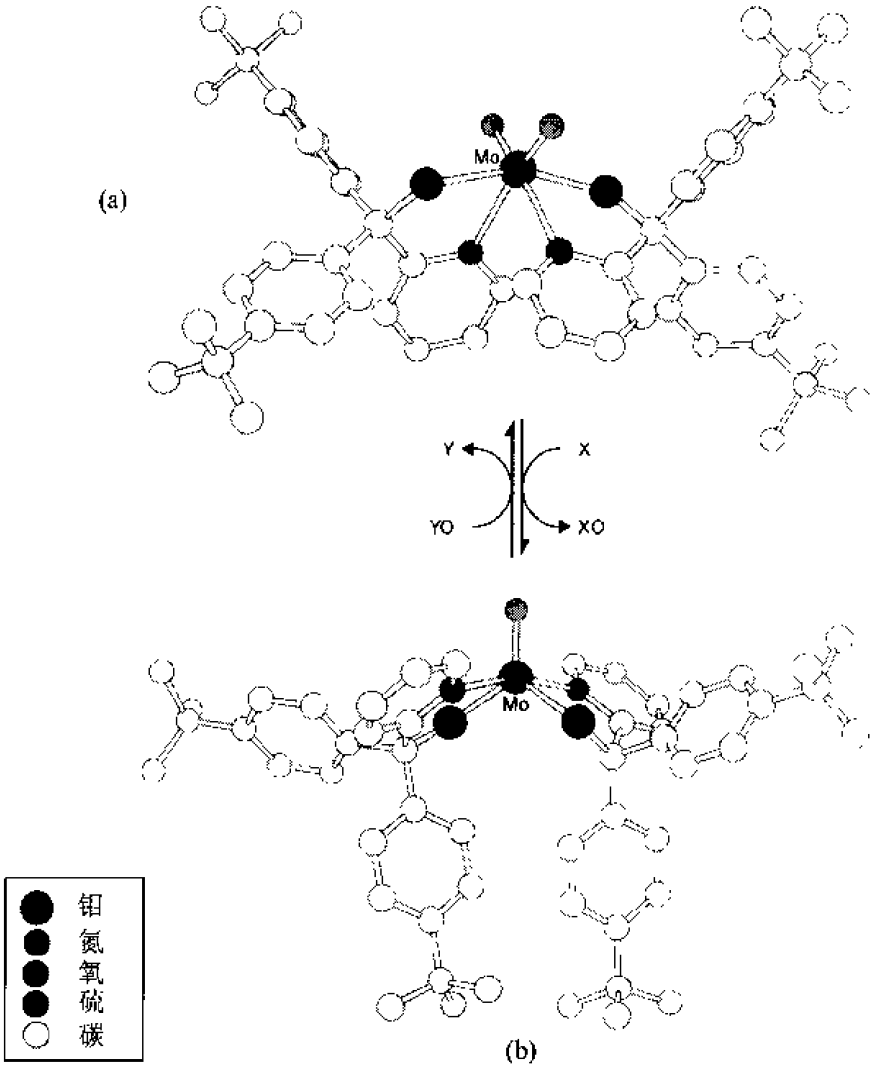


图 11.20 钼氧转移酶的模型

氧化形(a)和还原形(b)二者的结构均已由 X 射线晶体学测定

如同 11.1.a. iii 节述及的发生在肌红蛋白和血红蛋白模型的那样，这些 μ-氧物种代表了热力学稳定的死端，限制了许多配体作为酶模型配合物的应用。还原形[$MoO(L)_2$]配合物能和一系列氧原子给体反应，包括若干酶的底物，产生[$MoO_2(L)_2$]并伴随着底物的还原。例如，二甲亚砜是若干钼酶的底物，能被[$MoO(L)_2$]定量地还原为甲硫醚。

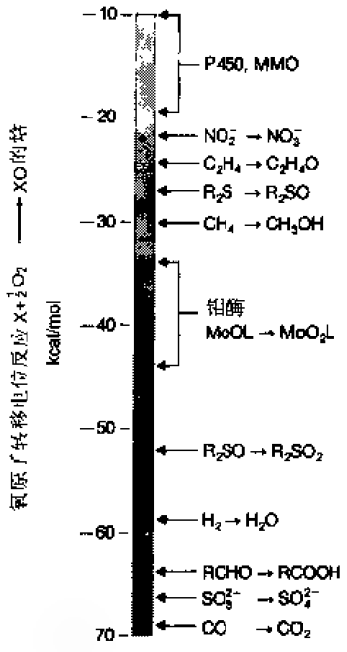


图 11.21　相对的氧原子转移焓

含钼和铁的酶基对定位于热力学上适宜的位置，以催化相应的生物反应

对这些模型配合物研究的最重要的观测之一，是证明了氧原子转移焓，示于图 11.21 中，其中双氧合钼(Ⅵ)/氧合钼(Ⅳ)对是该体系的关键特征。某些钼酶，如亚硫酸盐氧化酶，将氧原子转移到底物上；而其他的钼酶，包括硝酸盐还原酶，则从底物上转移氧原子。在这些酶中，钼中心理想地定位于热力学上适宜于进行这些不同的转移。上述特征表示在图 11.21 中，若干这些反应的相对氧原子转移焓的顺序和那些被细胞色素 P-450 和 MMO 催化的实例一致。

11.4　双氧的其他反应和副产物

11.4.a　保护性的金属酶：Cu-Zn 超氧化物歧化酶

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase，SOD)这种金属酶的功能是按式 11.17 的方式歧化超氧离子：

$$2O_2^- + 2H^+ \rightleftharpoons H_2O_2 + O_2 \qquad (11.17)$$

由式可见，产物之一的过氧化氢本身就是一种潜在的有害物质。过氧化氢被一种金属酶，即过氧化氢酶所清除，这将在下一节较详细地讨论。因此，SOD 和过氧化氢酶一致行动，清除 O_2 代谢过程中潜在的有毒副产物，以呵护生物体对双氧的利用。已知超氧化物歧化酶具有氧化还原活性的锰、铁或铜中心。此处我们仅集中于最后一种，即铜-锌超氧化物歧化酶上，这种酶有时也按异金属核称作黄铜酶。

(i) **铜超氧化物歧化酶及其化学**。60 年代后期发现了含铜的蛋白质，最初由各种不同的来

源中提取(从血红细胞中提取的血球铜蛋白,从肝中提取的肝铜蛋白等),称作铜蛋白,它们能催化超氧离子的歧化(式 11.17)。这些酶均由两条相同的亚基构成,每一条含一个铜和一个锌原子。上述功能的发现,导致对 Cu_2Zn_2 SOD 酶的进一步研究。运用快反应技术,很快建立起的催化机理有两步扩散控制步,如式 11.18a 和 11.18b 所示:

$$ECu^{II}+O_2^- \rightleftharpoons ECu^{I}+O_2 \qquad (11.18a)$$

$$ECu^{I}+O_2^-+2H^+ \rightleftharpoons ECu^{II}+H_2O_2 \qquad (11.18b)$$

这些反应有时也被称为"乒乓"机理,因为铜在它的两种常见氧化态间往复地变换。超氧离子在第二步的质子化,反映了上述两步反应均系热力学可行的。正如表 1.2 所指出的,O_2/O_2^- 对的氧化还原电位为 -0.33 V,而 O_2^-/H_2O_2 对的为 $+0.89$ V。因此,任何金属原子若能在 M^{n+} 和 $M^{(n+1)+}$ 态间进行单电子氧化还原化学,而它的电位在 $-0.3\ V \leqslant E^{\ominus} \leqslant +0.9$ V 范围内,从热力学上讲便能作为超氧化物歧化酶,因而对于自然界,除 Cu_2Zn_2 SOD 外,还存在 Fe、Mn 的 SOD,也就不足为奇了。然而,后二者的活性部位都仅有一单个的金属原子。

式 11.17 所示的超氧离子的歧化反应进行得很快,即使在无催化剂存在的情况下,未经催化的反应的二级速率常数为 $\approx 4\times10^5\ (mol/L)^{-1}\cdot s^{-1}$。酶催化反应的速率常数为 $\approx 2\times10^9\ (mol/L)^{-1}\cdot s^{-1}$,总的反应速率仅受 O_2^- 离子扩散到蛋白质活性部位的限制。在试图阐明需要 SOD 酶的理由时,对速率极快的超氧离子在活体内的浓度是否极低,曾有争议。当它被式 11.17的未催化过程歧化之前,就已和生物的细胞组织反应并损害生物组织。因此,酶的作用是在一个假定的保护功能中歧化超氧离子。虽然游离的金属离子也能有效地催化式 11.17 的反应,铜催化的反应的速率常数 $\approx 4\times10^9\ (mol/L)^{-1}\cdot s^{-1}$,但可以认为,未键合的铜(Ⅱ)或铁(Ⅲ)阳离子的浓度远远低于能与超氧化物歧化酶活性相比拟的程度,因此,它们在生命体系中并不重要。

(ii) **铜-锌超氧化物歧化酶的结构**。牛红细胞的超氧化物歧化酶已通过结晶制得,并用 X 射线衍射测定其结构,分辨率2 Å。其多肽骨架为一含 β-折叠层的 8 条反平行链构成的圆柱体,这是蛋白质结构一种普通的造型,即著名的 β-圆柱体。有两条这种多肽链来自 Cu_2Zn_2 SOD 蛋白质的二聚体。其中的金属结合部位示于图 11.22 中,铜(Ⅱ)离子和 4 个组氨酸侧链配位,它们是组氨酸-44、组氨酸-46、组氨酸-118 和组氨酸-61。此外,有证据表明轴向的第五个配体是水。有意思的是,组氨酸-44 和组氨酸-46 处于畸变的平面正方形 CuN_4 配位层的反位上,尽管它们在顺序上接近。二肽,即组氨酸 44-缬氨酸 45-组氨酸 46 完全阻塞了从 CuN_4 平面一侧到铜的通道。另一侧借助于一约4 Å宽的圆锥形沟槽,为溶剂接近铜提供了一条通道,并在蛋白质表面向溶液敞开。沟槽的衬里是带正电荷的氨基酸侧链的残基,包括顺序恒定的赖氨酸-134 ε-氨基酸基团,它位于沟槽的远端,距离 Cu 13 Å 处。可能正是这个残基定位于吸引扩散到蛋白质表面的 O_2^- 离子,并使它跌落到沟槽,再也不能以有害物种的形式返回。毗邻的谷氨酸-131 残基部分中和电荷,并协助确立驱赶 O_2^- 离子向带正电荷的 Cu^{2+}/Zn^{2+} 活性部位的静电梯度。沟槽中其他带电荷的残基包括谷氨酸-119、谷氨酸-130、赖氨酸-120 和精氨酸-141。

除活性部位的铜(Ⅱ)离子外,空腔的底部还含 Zn(Ⅱ)(图 11.22)。Zn(Ⅱ)离子处于四面体环境中,与之配位的是 3 个组氨酸残基,即组氨酸-69、78 和 61,最后的一个与铜离子桥联,还有一个是天冬氨酸-81 的羧基。在 Cu_2Zn_2 SOD 中咪唑基和双金属中心的桥联是一个新颖的结构特征,在从该酶中发现以前,在配位化学中尚未遇到过。

(iii) **锌的作用**。Cu_2Zn_2 SOD 中存在锌表明,超氧化物歧化酶的活性可能需要第二种金

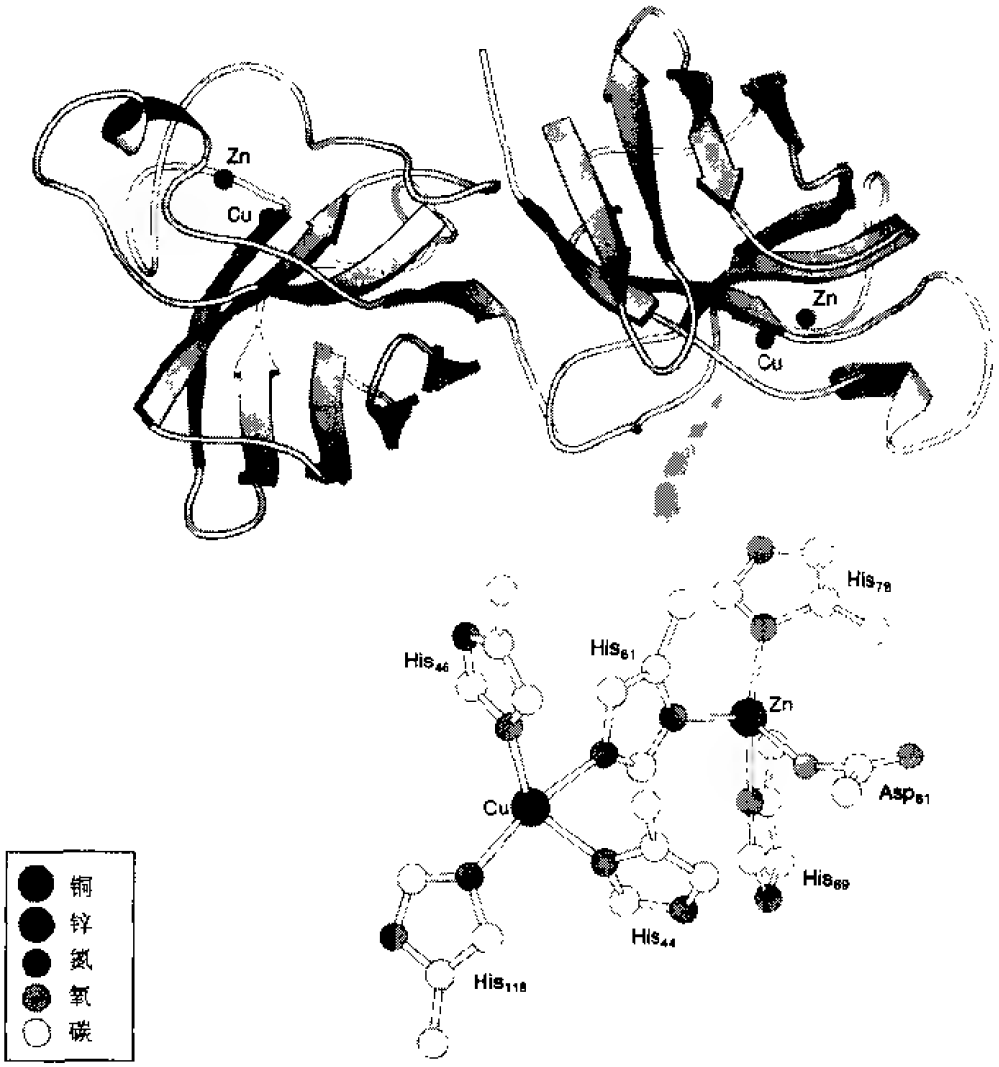


图 11.22　铜-锌超氧化物歧化酶的结构及其催化的双金属核

属。一个独特的设想示于图 11.23。在该机理的每一轮催化循环中，咪唑桥先被断开而后又重新形成。桥基断裂的速率和酶的循环速率一样快。和锌(Ⅱ)配位的组氨酸环的氮原子使另一个氮原子的 pK_a 由原来的 14 降低到≈7～10。结果，这第二个氮原子宁可与质子而不是与 Cu(Ⅰ)结合。这种选择使紧跟着酶机理的第一步之后，桥基断裂(式 11.18a 和图 11.23)。Cu(Ⅰ)再次氧化到Cu(Ⅱ)(式 11.18b)后，随同质子转移到过氧离子，且以 H_2O_2 的形式释出，桥联又重新形成。该机理在 Cu(Ⅰ)中心创造了一个开放的位置以结合 O_2^-，排除了需要一高能量的五配位过渡态的可能性。

和图 11.23 机理同样具有吸引力的，可能是随后的研究证实 Cu_2E_2 SOD 中锌的位置若是空的(E)，它的活性仍和全酶一样。那么 Zn^{2+} 在 SOD 中的实际作用究竟如何呢？一种可能性，正如前已提出的，是 Zn(Ⅱ)协助建立了电场梯度，以吸引 O_2^- 跌入 SOD 捕蝇草圆锥形的空腔中。O_2 和 H_2O_2 二者均为歧化反应的产物，它们皆为中性，因而很容易扩散出来，而 O_2^- 是阴离子，却不能。锌的另一种可能的作用是赋予蛋白质热稳定性。铜-锌 SOD 对热特别稳定，在75℃置于10mmol/L、pH为7.2的磷酸盐缓冲液中，7min后它的光谱性质和活性仍未改变。相

反，当把金属从酶中除去，它的热稳定性就显著降低。

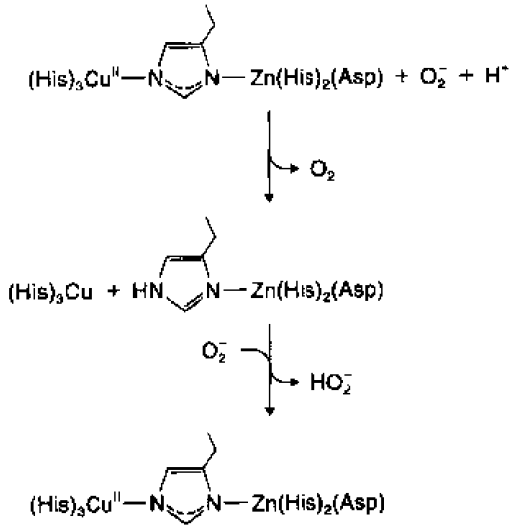


图 11.23　铜-锌超氧化物歧化酶可能的桥断裂机理

11.4.b　保护性的金属酶：过氧化氢酶和过氧化物酶

双氧的另一个重要的还原形是过氧化氢。现已发现许多酶均以过氧化氢为底物，或通过歧化作用将它转变为双氧和水，或把它作为一个氧化剂简单地加以摧毁。在这一节将要涉及的酶以及它们所催化的反应概括在表 11.7 中。所有这些酶在它们的活性部位均含血红素基团，尽管轴向配体的性质以及反应机理的细节很不相同。

表 11.7　含血红素的过氧化物酶和过氧化氢酶的反应

酶	反　应
细胞色素 *c* 过氧化物酶	$ROOH + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow ROH + H_2O$
辣根和菠菜过氧化物酶	$A\text{-}H_2 + H_2O_2 \longrightarrow A + 2H_2O$
氯过氧化物酶	$A\text{-}H + X^- + H^- + H_2O_2 \longrightarrow A\text{-}X + 2H_2O$
过氧化氢酶	$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$

从酵母提取的细胞色素 *c* 过氧化物酶含一条 294 个氨基酸的单链，其结构已由晶体法测定，分辨到1.7 Å，这曾在第 9 章扼要地述及。一个轴向的位置被组氨酸占据，类似于血红蛋白的情况，另一侧在静止的 Fe(Ⅲ)态则未被占据。辣根过氧化物酶和氯过氧化物酶的晶体结构尚未测定。然而，一系列波谱研究，包括 EXAFS 的详细研究，证实前者的轴向配体仍为组氨酸，后者则为半胱氨酸的硫醇根，使它的活性部位类似于细胞色素 P-450。这些活性部位血红素的配位作用示于图 11.24 中。

这些不同的酶具有大体上相同的反应机理，尽管细节很不相同，这将在以下讨论。式11.19 给出了共同的轮廓：

$$EPFe(Ⅲ) + H_2O_2 \overset{-H_2O}{\rightleftharpoons} EPFe(-2e^-) \overset{X}{\rightleftharpoons} X(-2e\ ) \cdots EPFe(Ⅲ) \qquad (11.19)$$

起始步为以 EPFe(Ⅲ)表示的酶被过氧化氢两电子氧化，并产生一分子水。这些酶两电子氧化形成的 EPFe($-2e^-$)的性质是一个广泛研究的课题。所有上述酶的这种形式，在铁中心均含一 Fe(Ⅳ)═O单元。铁-氧单元的形成是由于被移去了两个电子中的一个。对过氧化氢酶、辣根

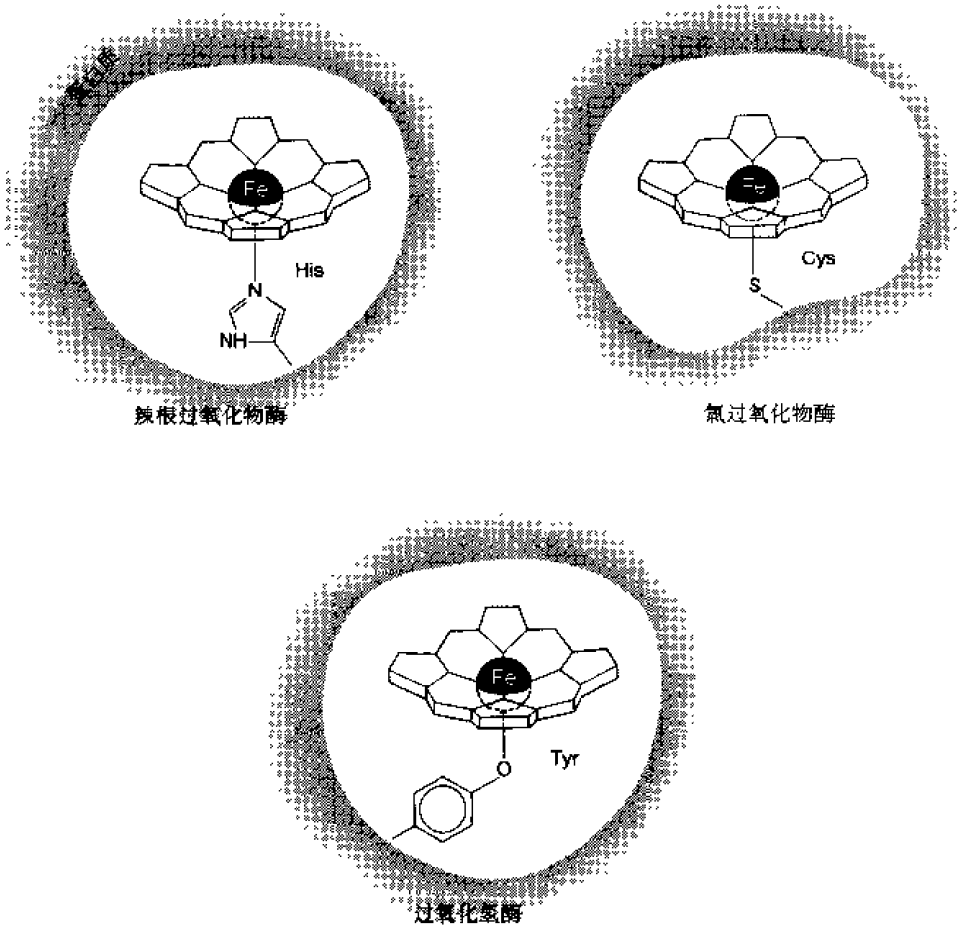


图 11.24　血红素在两个过氧化物酶和一个过氧化氢酶活性部位的配位作用

过氧化物酶和氯过氧化物酶，另一个电子由卟啉环而来，产生一阳离子自由基物种。这种态在辣根过氧化物酶中称为“化合物 I ”，类似于 11.2.a 节述及的细胞色素 P-450 反应循环中假设的活性氧化物。然而，对于细胞色素 c 过氧化物酶，该电子由蛋白质的侧链而来。最近，通过定点突变和详尽的 ENDOR 研究，已证明自由基位于色氨酸-191。该氨基酸吲哚环的取向和卟啉环垂直，和轴向的组氨酸配体平行并与之接触。此外，这两个芳香环各自与天冬氨酸-225 形成氢键。

一旦酶的两电子氧化物种形成，它们就能和物种 X 进行多种反应，恢复到 EPFe(Ⅲ)态。对过氧化氢酶或氯过氧化物酶，这一步通过和第二个等当量的过氧化氢反应来实现。在该反应中，过氧化物被氧化而不是断裂产生双氧。血红素中心的氧合基团则以水的形式释放。该反应也能一次发生一步，如对细胞色素 c 过氧化物酶，结果，两分子细胞色素 c 分步氧化。辣根过氧化物酶能和许多电子给体如烷基胺或硫化物发生类似的反应。氧合基团同样以水的形式释放出，而不转移到底物上。最后，对氯过氧化物酶，两电子氧化形能和氯化物反应，产生次氯酸盐，它能通过放出氢氧根将卤素转移到有机底物上。

过氧化氢酶能有效地使过氧化氢按式 11.20 发生歧化：

$$2H_2O_2 \rightleftharpoons O_2 - 2H_2O \tag{11.20}$$

过氧化氢酶是多亚基酶，分子量 250 kDa，在它们的活性部位含一血红素基团。从牛肝中提取的过氧化氢酶的结构已由晶体法测定。图 11.25 示出了该蛋白质。和一个轴向位置配位的是酪氨酸-357 脱质子酚的氧原子，这在血红素蛋白质中是一个独特的特征。另一个轴向位置空着以结合底物。位于末端的是苯丙胺酸-160 的苯环，它平行于并堆积在卟啉环一个吡咯环的平面上，同时以氢键与组氨酸-74 和天冬酰胺-174 相连，它们是酶催化功能的重要残基。

图 11.25　牛肝提取的过氧化氢酶的结构
需要强调的是其活性部位的血红素基团

由动力学研究建立起来的酶催化机理类似于 SOD。过氧化氢的歧化作用发生在两步（式 11.21a 和 11.21b）：

$$EFe^{\text{I}}+H_2O_2 \rightleftharpoons \text{化合物 I}+H_2O \tag{11.21a}$$

$$\text{化合物 I}+H_2O_2 \rightleftharpoons EFe^{\text{I}}+H_2O+O_2 \tag{11.21b}$$

明显地类似于式 11.18。在第一步，伴随着酶的氧化，底物还原为水。该氧化作用的产物“化合

物Ⅰ”，具有血红素的氧化还原水平，和细胞色素 P-450 的氧化态一致。最好写作 PFe═O oxenoid 物种。这并不足为奇，来自过氧化氢酶的“化合物Ⅰ”能和过氧化氢一样氧化甲酸盐、亚硝酸盐和乙醇。然后，H_2O_2 氧化形成双氧和水完成催化循环。

11.4.c 产生双氧自由基的体系

在氧化还原活性金属离子和双氧的反应中，有若干步产生的活性物种含未成对的电子。特别是超氧离子O_2^-和羟自由基 OH·，和 O_2 分子本身一样，它们都是无机的自由基。这些物种均在生物无机体系中用到，每一种都兼有电子偶合和原子转移化学，以完成特殊的功能。此处仅讨论 3 个实例以阐明共同的主题，它联系着这些在生物无机化学中看来似乎不相干的课题。它们是核苷酸还原酶(ribonucleotide reductase)、抗肿瘤的抗菌素争光霉素(antibiotic bleomycin)和一种用于描模或绘制核酸结构图，称为 Fe/EDTA 的体系。

(i) **核苷酸还原酶(RR)**。该酶在生物合成 DNA 的第一步催化由核糖核苷酸转变为脱氧核糖核苷酸(式 11.6)。因此，它是抗肿瘤和抗病毒剂的一个靶子，它的发展对选择性地抑制不健康细胞组织中的酶具有战略意义。例如，疱疹病毒的编码是 RR 用以发展疾病的基本依据。RR 酶含两种组分：一种是含金属的单元，它的功能是产生自由基；另一种则和底物结合，并通过移去环上 3′-H 原子引发的机理催化核糖 2′-羟基的脱羟基作用。有两类 RR 蛋白质，区别在于它们产生自由基的单元。一类用辅酶 B_{12} 作为辅因子，它涉及的化学将在 11.5 节中较详细地论述。另一类含一羧基桥联的双铁单元，类似于在 Hr 和 MMO 中所发现的。

由 *E.* 大肠杆菌而来的 RR 含铁 R2 亚基的结构示于图 11.15 中。使人特别感兴趣的是，其中存在一稳定的酪氨酰自由基，位于距双核$\{Fe_2O(O_2CR)\}^{3+}$中心一个铁原子≈5 Å 处。该中性的自由基在它的蛋白质环境中相对稳定，并给出特征的正交 EPR 谱，若用苯丙氨酸取代该酪氨酸，经定点突变研究，该酶失活，证明酪氨酰自由基在催化机理中的重要性。

酪氨酰自由基和酶的活性能被加入羟胺等试剂摧毁，它们相当于具有抗病毒的活性。该酶能通过将双铁中心还原为 Fe(Ⅱ)Fe(Ⅱ)形和加入双氧恢复活性。后一种反应现被认为按式 11.22的方式进行：

$$EFe^{II}Fe^{II} + Tyr\text{-}OH + O_2 + e^- + H^+ \longrightarrow EFe^{III}OFe^{III} + Tyr\text{-}O\cdot + H_2O \qquad (11.22)$$

该反应和细胞色素 P-450、MMO 及过氧化氢的酶利用双氧-铁化学(式 11.11、11.10 和图 11.12)间的类似性，证实了电子转移和双氧断裂的偶合，在生物无机体系中能用以产生在机理上重要的酪氨酰自由基。式 11.22 所表达的化学内涵仍是一个活跃的研究课题，例如，式中所示的电子来源至今仍是一个谜。

(ii) **小分子 DNA 断裂剂，争光霉素和铁-EDTA**。现发现某些产生自由基体系的小分子金属离子配合物能断裂 DNA。第一个被广泛研究的这类分子就是天然产物争光霉素，它的结构式示于图 3.23 中。在铁(Ⅱ)和双氧或铁(Ⅲ)和过氧化氢的存在下，争光霉素能促使单股或双股的 DNA 断裂。尽管争光霉素有显著的作用，但对它的这种铁配合物的结构仍稍有争议，虽然金属结合部位看来在分子左手侧肽域而不在双噻唑单元。关于活性，过氧化铁(Ⅲ)或高价物种，可能是铁(Ⅴ)-氧单元，能从 DNA 的脱氧核糖环上提取氢原子。导致 DNA 断裂的化学，曾通过多种适用于 DNA 自由基反应的手段广泛而细致地进行过研究。图 11.26 的简单图解概括了某些相关的反应。

羟自由基在研究 DNA 和 DNA-蛋白质配合物的结构性质上也有很大的用处。正如图

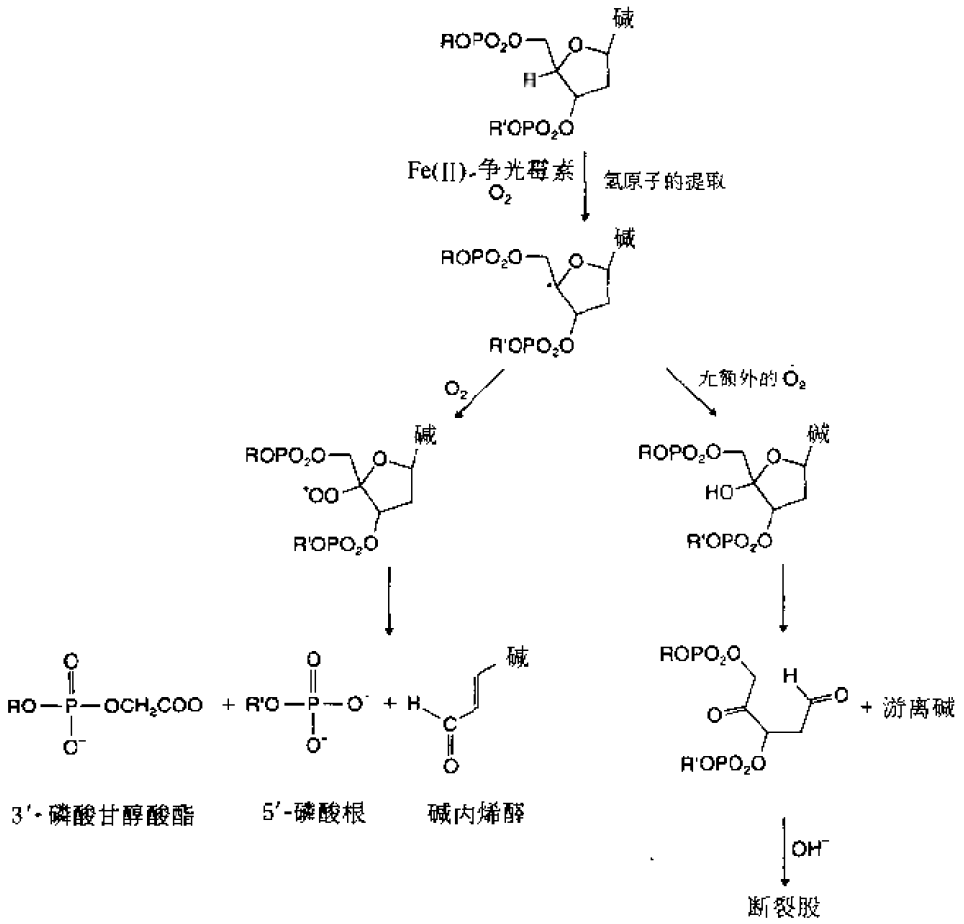


图 11.26　争光霉素断裂 DNA 的机理图

包括起始的氢原子提取和随后与额外的双氧有关或与双氧无关的步骤

11.27所示，在过氧化氢和还原剂如抗坏血酸的存在下，上述物种能通过 Fenton 反应有效地从 Fe(Ⅱ)-EDAT 中产生。OH· 自由基能扩散并从 DNA 上提取氢原子，在随后的化学过程中再次导致 DNA 的断裂。现已应用或正在发展上述这些以及其他的试剂，通过氢原子提取和自由基化学来促进 DNA 或 RNA 的断裂。多种体系的差别在于氢提取剂的不同，可能是一个金属配合物，它通常和 DNA 键合(如在争光霉素中那样)，或一个能自由扩散的物种如羟自由基。

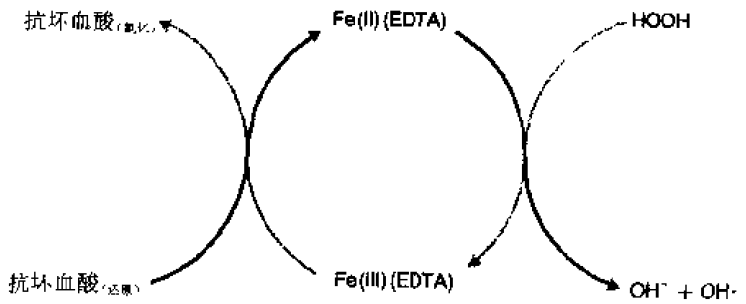


图 11.27　Fenton 反应

其中亚铁离子和过氧化氢反应产生羟基自由基和氢氧根离子

(还原剂，如抗坏血酸的存在，能催化反应的进行)

11.5 与辅酶 B_{12}相关的反应

有机金属化合物被定义为存在金属-碳键。无机化学家对这类化合物颇感兴趣，而且这类化合物在有机合成和催化中的重要性与日俱增。然而，在生物体系中已知的实例却很少。一个著名的例外是维生素 B_{12}，它是许多酶催化转移所必需的辅酶。主要的功能单元是 Co—C 键，当发生这些反应时，Co—C 键断裂。这个具有里程碑意义的化合物在许多研究领域中起着重要的作用，而且继续成为研究的课题。把它包括在这一章里，是由于自然界用以产生在基团转移反应中所必需的自由基，而基团转移反应又和金属/双氧反应类似。Co—C 键的均裂产生自由基。和 B_{12}及 Fe/O_2 二者相关的核苷酸还原酶的存在，恰好说明了和这些功能相关的生物无机体系间的天然联系。

11.5.a 历史的回顾

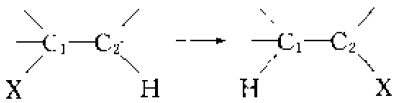
1926 年发现患恶性贫血症的病人能通过大量食用肝得以有效地治疗。从肝中提纯的这种活性组分是一种钴的配合物，近似的经验式为 $C_{61\sim64}H_{89\sim90}N_{14}O_{13\sim14}PCo$。该化合物的结晶虽适宜于进行 X 射线衍射分析，但在那时(1948 年)尚未解出过如此复杂的结构。

尽管综合运用了化学和晶体学的方法，但直到 1956 年才测定出它的结构。结果示于图1.6 中。分子的中心含一咕啉环，下方垂吊着二甲苯并咪唑单元。咕啉环类似于先前讨论过的血红素蛋白中的卟啉环(见图 1.3 和 1.6 及第 3 章)，但少一个碳原子和 A、D 环键合。此外，卟啉环含全数的双键，而咕啉系的双键却少得多。所有咕啉环外围的碳中心均为 sp^3 杂化并呈四面体型，而相应的卟啉环中心却为 sp^2 杂化并呈平面三角形。这些差别导致卟啉无手性中心，而维生素 B_{12}的咕啉环却有 9 个。在该结构的中心为一个八面体配位的钴(Ⅲ)离子。咕啉环有 4 个等同的氮给体配体，轴向的配体为一下垂的苯并咪唑环和氰离子。后者存在于最初分离结晶的衍生物中，称为氰钴胺素。能用晶体法测定出它的结构，表明这种技术能有效地用于复杂的分子。氰钴胺素轴向的氰根是在分离过程中人为造成的。在酶催化反应中有用的物种是辅酶 B_{12}。在该化合物中，第六个配体为 5′-脱氧腺苷基，如图 1.6 所示。该化合物的结构于 1962 年确立。此有机金属化合物有一金属-烃基键，Co—C 距离(2.05±0.05)Å，Co—C—C 角接近 130°。

辅酶 B_{12}的生物合成是通过还原 Co(Ⅲ)的维生素衍生物经 Co(Ⅱ)最终到 Co(Ⅰ)的氧化还原水平实现的。在最后的形式中，金属中心为富电子型，因而具有亲核性。它进攻 ATP 的 5′碳原子并取代三磷酸根形成 Co—C 键。该反应相当于在钴中心的氧化加成，将它氧化到钴(Ⅲ)态。上述化学证实了维生素 B_{12}功能中利用多重钴氧化态的重要性，并和本章前已述及的铁的氧化还原化学具有明显的类似性。

11.5.b 酶催化反应和催化机理

某些与辅酶 B_{12}相关的酶催化反应示于图 11.28 中。而某些由辅酶 B_{12}促进的反应才真正构成氧化还原化学，例如，将核糖核苷还原为脱氧核糖核苷三磷酸盐，有些则为简单的重排，式 11.23 表示了一般的形式：



(11.23)

由式 11.23 可见，这些反应均包含了 1,2-碳的变位，其中取代基 X 和相邻碳中心上的氢原子

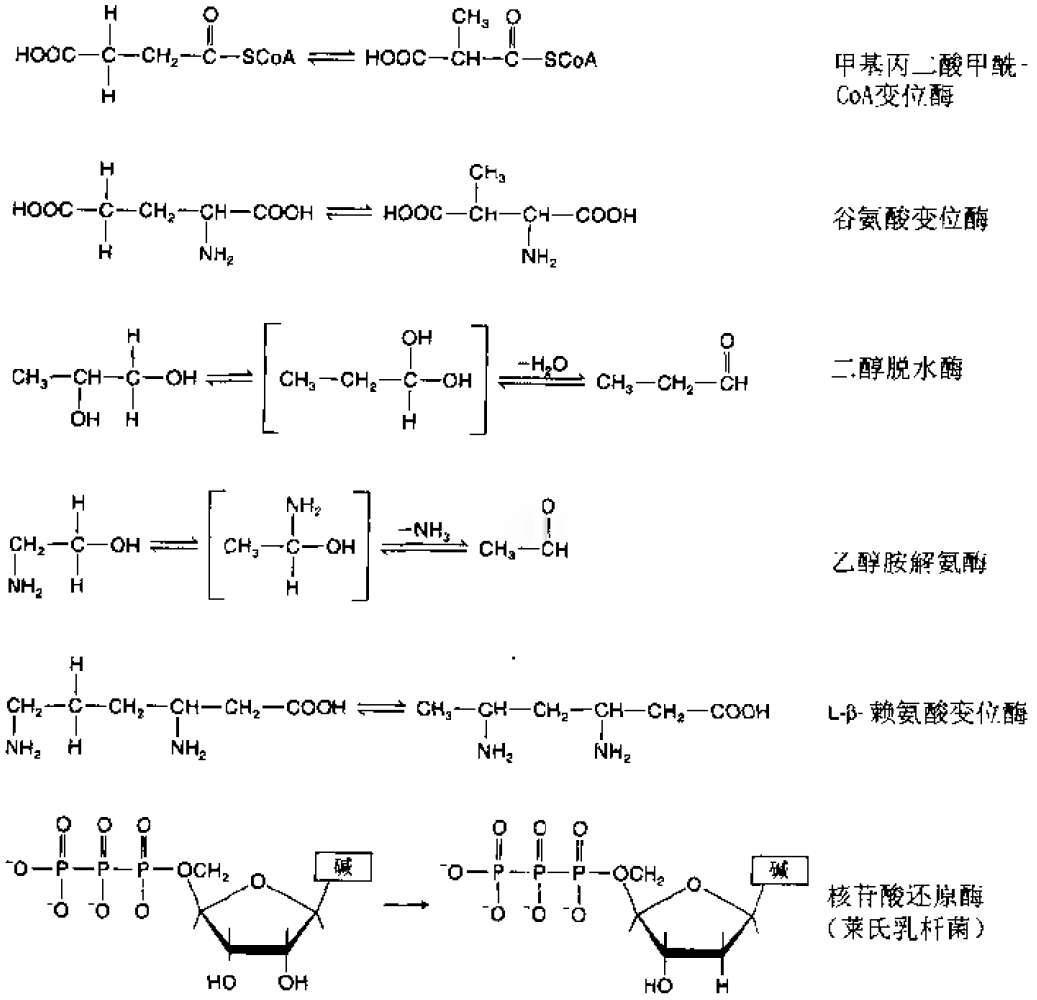


图 11.28　与辅酶 B_{12} 相关的酶催化反应

相互交换。图 11.29 表示了这种重排的机理图示。第一步包含 Co—C 键的均裂形成一Co(Ⅱ)物种加上一个脱氧腺苷自由基。该自由基从底物提取一个氢原子形成底物自由基，然后再进行重排。这一步有许多可能的机理，不同的机理适用于不同的酶催化反应。这种可能性包括自由基直接重排形成产物；电子由自由基转移到钴中心，产生Co(Ⅰ)物种和一底物的碳阳离子，然

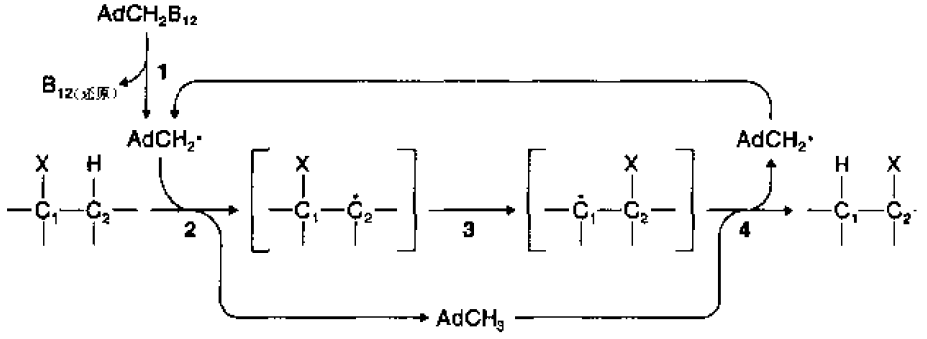


图 11.29　发生在许多由辅酶 B_{12} 激活的酶中心的 1,2-变位机理图示

后重排；电子由钴转移到底物的自由基上，形成一Co(Ⅱ)物种和一底物的碳阴离子，然后再重排；或底物的自由基和钴偶合，形成额外的有机金属物种，它是重排的中间体。但不管重排步详细的中间过程如何，产生的自由基必须使从底物提取的氢原子脱离脱氧腺苷部分，提供给产物，并重新产生起始的脱氧腺苷自由基。产物的释放和底物的结合允许链反应继续而无须再附加起始的Co—C 键的断裂。

大量的证据支持上述图解。自由基中间体，一个低自旋 d^7 Co(Ⅰ)配合物和一个碳基自由基已直接通过EPR谱观测到。此外，它们形成的速率在动力学上与酶催化过程的总速率一致。在一组系列的实验中，一份二醇脱水酶加上五等份的辅酶 B_{12} 和1,2-丙二醇混合，在10 ms内将试样置于−140℃的异戊烷中冷冻。试样的EPR谱(图11.30)基本上和酶、辅酶和底物混合

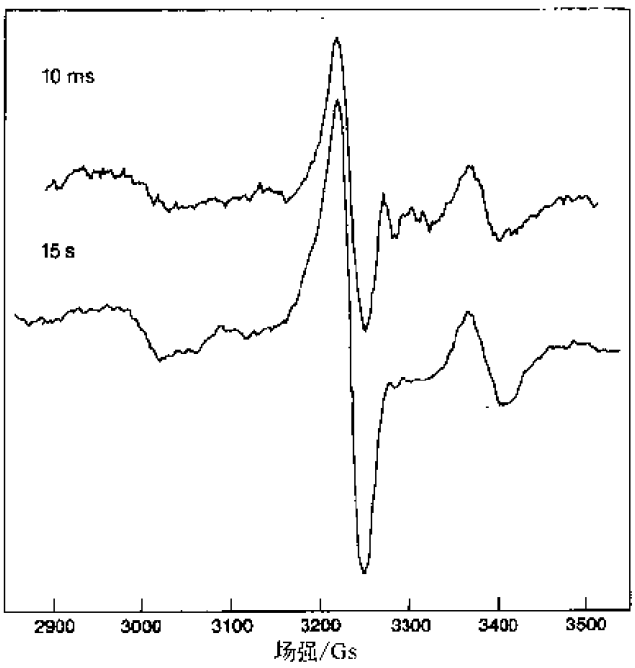


图 11.30　当二醇脱水酶和五等份的辅酶 B_{12} 置于 1,2-丙二醇中得到的电子顺磁共振信号

共振信号表明了持续产生脱氧腺苷自由基[引自 J.E. Valinsky et al., *Journal of the American Chemical Society* 96, 4709～4710 (1974)]

物的EPR谱等同，然后让它们反应15 s。结果，$t_{1/2}$<3 ms用以形成自由基，至少比酶催化反应的总速率快2～3倍。谱的双重积分表明，每摩尔酶的总自旋为1.2，和有效的转变为Co(Ⅱ)+R·形相符，说明有两个自由自旋的单体。脱氧腺苷自由基中间体进一步为同位素标记研究所证实。辅酶 B_{12} 由亚甲基和钴键合来制备，而钴用单个的氚原子非立体有选择的标记。用该标记的辅酶和二醇脱水酶反应，结果显示所有的氚均转移到产物丙醛上。

上述结果表明，氢非立体有选择的转移到产物上。因此，在催化过程中，这两个亚甲基上的氢原子必须成为等同的，若在Co—CH_2 键断裂后，脱氧腺苷自由基从底物上提取一氢原子，并在脱氧腺苷上形成一自由转动的甲基，便和上述事实取得一致。

11.5.c 酶作用中的热力学因素

以上讨论的数据表明，辅酶 B_{12} 的功能好似一游离的自由基源。Co—C 键有足够的活性均裂产生脱氧腺苷自由基和 Co(Ⅱ)咕啉配合物，而且速率与催化所需的总速率一致。上述观测推动了对 Co—C 键能的强度以及决定键能的因素的研究。解离强度通过动力学的方法按下述方式测定。考虑式 11.24 所表示的路线：

$$\text{Ado-B}_{12}(\text{Co}^{\text{Ⅱ}}) \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \text{Ado}\cdot + \text{B}_{12}(\text{Co}^{\text{Ⅰ}}) \qquad (11.24)$$

$$\text{Ado}\cdot + \text{阱} \xrightarrow[k_2]{\text{快}} \text{Ado-阱}$$

以钴配合物 $Co(DH)_2$ 为捕获剂，其中 DH 代表丁二酮肟基配体，反应在接近 100℃ 水中有适宜的速率。k_1 与温度有关，与脱氧腺苷自由基形成有关的活性参数，经测定 $\Delta H^{\ddagger}=28.6$ kcal/mol，$\Delta S^{\ddagger}=2$ cal/(mol·deg)。综合上述两个反应，k_{-1} 和 k_2 像是由扩散控制，按≈2 kcal/mol 来修正 $\Delta H^{\ddagger}$，把这个结果用以估算 Co—C 键的解离能，则接近 26 kcal/mol。用稳定的一氢化氮分子在 1,2-亚乙基二醇溶液中作为自由基的阱，得到的数值稍高，为 31.5 kcal/mol。

关于键的解离能有两点很重要：(i) 它相对是低的。典型的 C—C 单键的解离能为 80～90 kcal/mol。(ii) 若无其他的影响，用于催化反应它仍然太高，例如，削弱 Co—C 键附加的因素是辅酶和酶之间的作用。由实验测定的 $\Delta H^{\ddagger}$ 和 $\Delta S^{\ddagger}$ 的数值可用以估算 37℃ 时 $\Delta G^{\ddagger}$ 的数值。计算的能量为 28～30 kcal/mol，相应于速率常数 $k_1\approx10^{-7}\sim10^{-8}\,s^{-1}$。酶，如二醇脱水酶，将速率提高到接近 $10^2\,s^{-1}$。因此，和辅酶 B_{12} 结合的酶必须进一步使键的解离能降低到接近原来的一半，以便产生的自由基源能在实用的速率中运作。

至少有两种降低解离能的机理似有道理，并已在一定程度上用模型体系进行过试验。

第一种机理含轴向配体的电子影响，该轴向配体处于产生自由基的键的反位上。由于键的解离伴随着钴中心由 Co(Ⅲ)到 Co(Ⅱ)的还原，可以预期，轴向配体给电子能力(碱性)的降低应能稳定 Co(Ⅱ)形态，从而使键的解离能降低。如上所述，此概念曾用电子等同空间位阻的吡啶碱系列和二丁二酮肟合钴模型体系试验过。结果，观测到吡啶配体的 pK_a 和从动力学上测定的键的解离能间呈线性关系。

第二种能影响 Co—C 键强的因素是咕啉环和脱氧腺苷单元间的空间相互作用。正如当初在测定辅酶 B_{12} 结构时就已经注意到的，Co—C—C 角明显的大于 109.5°。审视辅酶的结构证实了脱氧腺苷基、咕啉环及其取代基间存在某些密切的联系。其结果提出了一种机理，即酶能削弱 Co—C 键。通过咕啉环适当的变形，环取代基和脱氧腺苷基间能引入空间的相互作用，并导致辅酶的扭曲，可以认为这是由于 Co—C 键的断裂所致。这种空间相互作用所引起的后果也已经通过二丁二酮肟合钴模型体系和以不同的叔膦作轴向配体进行过探索。此外，还用钴的八乙基卟啉衍生物进行过对照研究，得到某些有意思的结果。正如图 11.31 所表示的丁二酮肟配合物，它的键解离能和膦配体的立体性质极其相符，这是从测定的锥体角的意义上而不是从它们的碱性上讲的。因此，一个大的但碱性很强的膦，如三环己基膦构成的配合物，它的键解离能却很低。相反，相应的八乙基卟啉衍生物，键解离能和膦的碱性很符合，而不是和它的立体参数相符(图 11.31)。

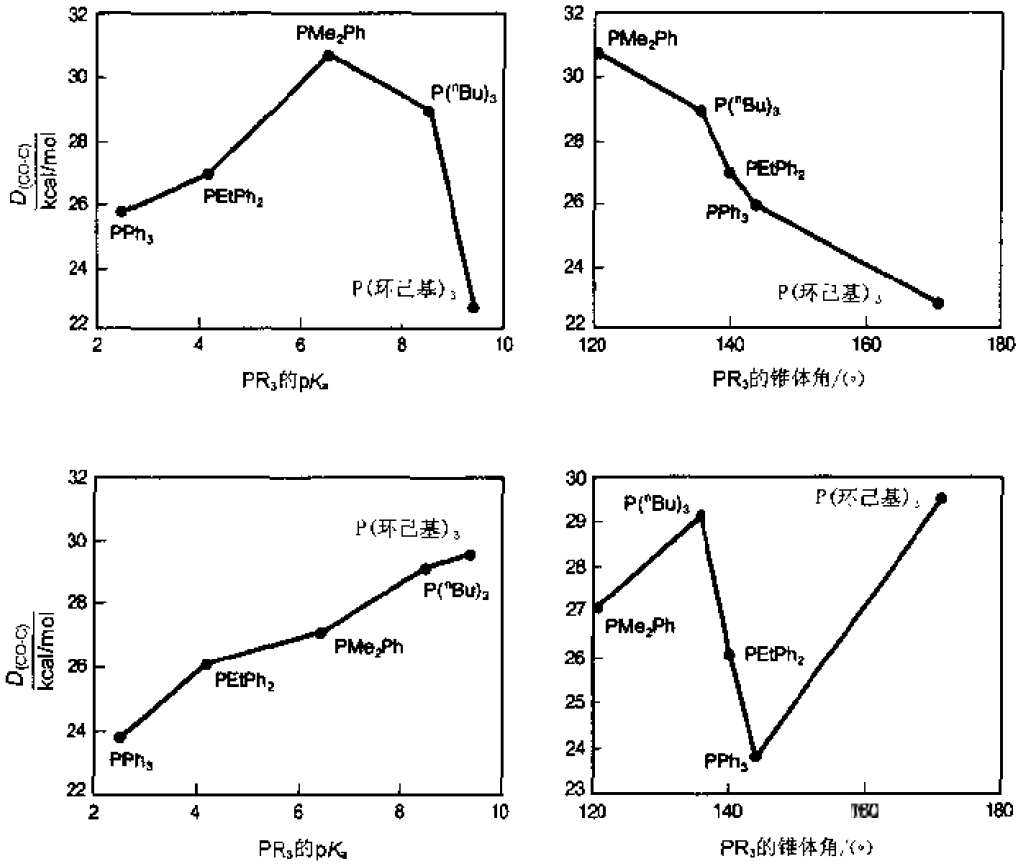


图 11.31　Co—C 键的解离能和 pK_a 值(左)及各种膦配体锥体角(右)的相关性

上面两幅图为丁二酮肟合钴苄基配合物，下面两幅图为相应的钴八乙基卟啉苄基衍生物

[引自 M. K. Geno and J. Halpern, *Journal of the American Chemical Society* 109, 1238～1240 (1987)]

上述结果可用这两个体系的柔韧性不同来解释。二丁二酮肟配合物的柔韧性比卟啉配合物的强，因此，当它和一个有空间要求的轴向配体结合时，就能传递到配位于赤道面另一侧的烷基上。由于咕啉体系的不饱和程度较低，因此，较相应的卟啉体系柔韧性强。这种解释提出了一个理由，为何大自然选择咕啉大环用以产生和存储碳-自由基等当物。

最后，我们回到重排过程本身。如同许多反应一样，和辅酶 B_{12} 相关的转移反应的细节很难彻底阐明。对多种酶立体化学的研究证实重排行为涉及的面很广，从而需要用模型体系来验证某些假设机理的化学和动力学的可行性。例如，已经制备出某些设想的有机金属中间体的类似物并进行了研究，该中间体由最初形成的自由基和二醇脱水酶的 Co(Ⅱ)中心通过偶合形成。这些配合物并没有发生预期的化学，但它们实际上确切地代表了酶催化过程的中间体。相反，解析各别产生的自由基物种的化学，即对应于甲基丙二酸甲酰-CoA 变位酶反应可能的中间体，表明它们确实在所要求的速率附近发生了适当的重排。

今后有关的化学和酶催化的研究需进一步巩固和延伸，但有一点似乎已经清楚，即作为酶的辅酶 B_{12} 中钴的基本功能是为自由基的存储和释放提供一个场所，而不是作为底物重排的催化中心。

习　题

1. 正如本章所指出的，许多Co(Ⅱ)配合物能结合双氧。例如，$[Co(CN)_5]^{3-}$和O_2反应，产生双核形配合物$[(CN)_5Co—O_2—Co(CN)_5]^{6-}$。尽管原料是顺磁性的，而产物却是反磁性的。试给出产物的电子结构式(氧化形)。如何验证你的假设？
2. 细胞色素P-450被视为氧化酶，在每一个催化循环中，它们均消耗一份等量的还原剂NADH。为什么需要NADH？在总的反应中哪一个原子在形式上被还原？
3. 是否可能产生超氧化物歧化酶衍生物在所有的金属位置上均为铜(铜取代了锌)，或在所有的金属位置上均为锌(锌取代了铜)？你能预示这些衍生物中的哪一个具有活性吗？你能预示这两种衍生物的磁性如何吗？
4. 某些含钼的酶能将亚砜(R_2SO)还原为相应的硫化物(R_2S)。然而，企图用它们将相应的砜(R_2SO_2)转变为亚砜或硫化物的尝试却均未成功。试提出上述观测的解释。

参 考 文 献

双氧输运

J. P. Collman, T. R. Halpern, and K. S. Suslick. 1980. "O_2 Binding to Heme Proteins and Their Synthetic Analogs," in T. G. Spiro, ed., *Metal-Ion Activation of Dioxygen*. Wiley-Interscience, New York, 1~72.

R. E. Dickerson and I. Geis. 1983. *Hemoglobin: Structure, Function, Evolution, and Pathology*. Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA.

H. D. Ellerton, N. F. Ellerton, and H. A. Robinson 1983. "Hemocyanin—A Current Perspective." *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 41, 143~248.

N. Kitajima, K. Fujisawa, C. Fujimoto, Y. Moro-oka, S. Hashimoto, T. Kitagawa, K. Toriumi, K. Tatsumi, and A. Nakamura. 1992. "A New Model for Dioxygen Binding in Hemocyanin: Synthesis, Characterization, and Molecular Structure of μ-η^2,η^2 Peroxo Dinuclear Copper(II) Complexes, $[Cu(HB(3,5\text{-}R_2pz)_3]_2(O_2)$ (R = i-Pr and Ph)." *J. Am. Chem. Soc.* 114, 1277~1291.

D. M. Kurtz, Jr. 1990. "Oxo- and Hydroxo-Bridged Diiron Complexes: A Chemical Perspective on a Biological Unit." *Chem. Rev.* 90, 585~606.

S. J. Lippard. 1988. "Oxo-Bridged Polyiron Centers in Biology and Chemistry." *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 27, 344~361.

M. F. Perutz, G. Fermi, B. Luisi, B. Shaanon, and R. C. Liddington. 1987. "Stereochemistry of Cooperative Mechanisms in Hemoglobin." *Acc. Chem. Res.* 20, 309~321.

L. Que, Jr., and A. E. True. 1990. "Dinuclear Iron- and Manganese-Oxo Sites in Biology," in S. J. Lippard, ed., *Progress in Inorganic Chemistry*, Volume 38. Wiley-Interscience, New York, 97~200.

E. I. Solomon, M. J. Baldwin, and M. D. Lowery. 1992. "Electronic Structures of Active Sites in Copper Proteins: Contributions to Reactivity." *Chem. Rev.* 92, 521~542.

Z. Tyeklár and K. D. Karlin. 1989. "Copper-dioxygen Chemistry: A Bioinorganic Challenge." *Acc. Chem. Res.* 22, 241~248.

P. C. Wilkins and R. G. Wilkins. 1987. "The Coordination Chemistry of the Binuclear Iron Site in Hemerythrin." *Coord. Chem. Rev.* 79, 195~214.

氧原子转移反应：Fe

L. A. Andersson and J. H. Dawson. 1991. "EXAFS Spectroscopy of Heme-Containing Oxygenases and Peroxidases." *Struct. and Bond.* 74, 1~40.

M. J. Coon and R. E. White. 1980. "Cytochrome P-450, a Versatile Catalyst in Monooxygenation Reactions," in T. G. Spiro, ed., *Metal Ion Activation of Dioxygen*

Wiley-Interscience, New York, 73~123.
J. H. Dawson. 1988. "Probing Structure-Function Relations in Heme Containing Oxygenases and Peroxidases." *Science* 240, 433~439.
P. G. Debrunner, I. C. Gunsalus, S. G. Sligar, and G. C. Wagner. 1978. "Monooxygenase Hemoproteins: Cytochromes P-450," in H. Sigel ed., *Iron in Model and Natural Compounds. Metal Ions in Biological Systems*, Volume 7. Marcel Dekker, New York, 242~277.
J. T Groves. 1980. "Mechanisms of Metal-Catalyzed Oxygen Insertion," in T. G. Spir ed., *Metal Ion Activation of Dioxygen*. Wiley-Interscience, New York, 125~162.
F. P. Guengerich. 1991. "Reactions and Significance of Cytochrome P-450 Enzymes." *J. Biol. Chem.* 266, 10019~10022.
F. P. Guengerich and T. L. Macdonald. 1990. "Mechanisms of Cytochrome P-450 Catalysis." *FASEB J.* 4, 2453~2459.
H. G. Jang, D. D. Cox, and L. Que, Jr. 1991. "A Highly Reactive Functional Model for the Catechol Dioxygenases: Structure and Properties of [Fe(TPA)DBC]BPh_4." *J. Am. Chem. Soc.* 113, 9200~9204.
M. Nozaki and O. Hayashi. 1984. "Dioxygenases and Monooxygenases," in J. V. Bannister and W. H. Bannister, eds., *The Biology and Chemistry of Active Oxygen*. Elsevier, New York, 68~104.
P. R. Ortiz de Montellano. 1986. *Cytochrome P-450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Plenum Press, New York.
T. D. Porter and M. J. Coon. 1991. "Cytochrome P-450: Multiplicity of Isoforms, Substrates, and Catalytic and Regulatory Mechanisms." *J. Biol. Chem.* 266, 13469~13472.
A. C. Rosenzweig, C. A. Frederick, S. J. Lippard, and P. Nordlund. 1993. "Crystal Structure of a Bacterial Non-haem Iron Hydroxylase that Catalyzes the Biological Oxidation of Methane." *Nature* 366, 537~543.

氧原子转移反应：Mo

M. W. W. Adams and L. E. Mortenson. 1985. "Mo Reductase: Nitrate Reductase and Formate Dehydrogenase," in T. G. Spiro, ed., *Molybdenum Enzymes*. Wiley-Interscience, New York, 519~593.
M. J. Barber, M. P. Coughlan, K. V. Rajagopalan, and L. M. Siegel. 1982. "Properties of the Prosthetic Groups of Rabbit Liver Aldehyde Oxidase: A Comparison of Molybdenum Hydroxylase Enzymes." *Biochemistry* 21, 3561~3568.
R. C. Bray. 1988. "The Inorganic Biochemistry of Molybdoenzymes." *Quart. Rev. Biophys.* 21, 299~329.
S. J. N. Burgmayer and E. I. Stiefel. 1985. "Molybdenum Enzymes, Cofactors, and Model Systems, The Chemical Uniqueness of Molybdenum." *J. Chem. Ed.* 62, 943~953.
S. P. Cramer and E. I. Stiefel. 1985. "Chemistry and Biology of the Molybdenum Cofactor," in T. G. Spiro, ed., *Molybdenum Enzymes*. Wiley-Interscience, New York 411~441.
S. F. Gheller, B. E. Schultz, M. J. Scott, and R. H. Holm. 1992. "A Broad-Substrate Analogue Reaction System of the Molybdenyum Oxotransferases," *J. Am. Chem. Soc.* 114, 6934~6935.
E. W. Harlan, J. M. Berg, and R. H. Holm. 1986. "Thermodynamic Fitness of Molybdenyum(IV,VI) Complexes for Oxygen Atom Transfer Reactions, Including Those with Enzymatic Substrates." *J. Am. Chem. Soc.* 108, 6992~7000.
T. R. Hawkes and R. C. Bray. 1984. "Quantitative Transfer of the Molybdenum Cofactor from Xanthine Oxidase and from Sulphite Oxidase to the Deficient Enzyme of the *Nit-1* Mutant of *Neurospora crassa* to Yield Active Nitrate Reductase." *Biochem. J.* 219, 481~493.

S. M. Hinton and D. Dean. 1990. "Biogenesis of Molybdenum Cofactors." *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 17, 169~188.

R. H. Holm and J. M. Berg. 1986. "Toward Functional Models of Metalloenzyme Active Sites: Analogue Reaction Systems of the Molybdenum Oxo Transferases." *Acc. Chem. Rev.* 19, 363~370.

B. E. Schultz, S. F. Gheller, M. C. Muetterties, M. J. Scott, and R. H. Holm. 1993. "Molybdenum-Mediated Oxygen Atom Transfer: An Improved Analogue Reaction System of the Molybdenum Oxotransferases." *J. Am. Chem. Soc.* 115, 2714~2722.

双氧原子其他反应和副产物

J. M. Bollinger, Jr., D. E. Edmondson, B. H. Hyunh, J. Filley, J. R. Norton, and J. Stubbe. 1991. "Mechanism of Assembly of the Tyrosyl Radical-Dinuclear Iron Cluster Cofactor of Ribonucleotide Reductase." *Science* 253, 292~298.

G. Cohen and R. A. Greenwald. 1983. *Oxy Radicals and Their Scavenger Systems*, Volumes 1 and 2. Elsevier Biomedical, New York.

J. A. Fee. 1980. "Superoxide, Superoxide Dismutases and Oxygen Toxicity," in T. G. Spiro, ed., *Metal Ion Activation of Oxygen*. Wiley-Interscience, New York, 209~237.

I. Fridovich. 1989. "Superoxide Dismutases." *J. Biol. Chem.* 264, 7761~7764.

E. D. Getzoff, J. A. Tainer, P. K. Weiner, P. A. Kollman, J. S. Richardson, and D. C. Richardson. 1983. "Electrostatic Recognition Between Superoxide and Copper, Zinc Superoxide Dismutase." *Nature* 306, 287~290.

S. M. Hecht. 1986. "The Chemistry of Activated Bleomycin." *Acc. Chem. Res.* 19, 383~391.

A. M. Michelson, J. M. McCord, and I. Fridovich. 1977. *Superoxide and Superoxide Dismutases*. Academic Press, London.

A. M. Pyle and J. K. Barton. 1990. "Probing Nucleic Acids with Transition Metal Complexes," in S. J. Lippard, ed., *Progress in Inorganic Chemistry*, Volume 38. Wiley-Interscience, New York, 413~475.

T. J. Reid III, M. R. N. Murthy, A. Sicignano, N. Tanaka, W. D. L. Musick, and M. G. Rossman. 1981. "Structure and Heme Environment of Beef Liver Catalase at 2.5 Å Resolution." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4767~4771.

G. Rotilio, ed. 1986. *Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology, and Medicine*. Elsevier, Amsterdam.

D. S. Sigman. 1986. "Nuclease Activity of 1,10 Phenanthroline—Copper Ion." *Acc. Chem. Res.* 19, 180~186.

J. Stubbe. 1990. "Ribonucleotide Reductases: Amazing and Confusing." *J. Biol. Chem.* 265, 5329~5332.

J. Stubbe and J. W. Kozarich. 1987. "Mechanisms of Bleomycin-Induced DNA Degradation." *Chem. Rev.* 87, 1107~1136.

J. A. Tainer, E. D. Getzoff, J. S. Richardson, and D. C. Richardson. 1983. "Structure and Mechanism of Copper, Zinc Superoxide Dismutase." *Nature* 306, 284~287.

T. D. Tullius. 1987. "Chemical 'Snapshots' of DNA: Using the Hydroxyl Radical to Study the Structure of DNA and DNA-Protein Complexes." *TIBS* 12, 297~300.

T. D. Tullius, ed. 1989. *Metal-DNA Chemistry*. ACS Symposium Series, Number 402. American Chemical Society, Washington, DC.

J. S. Valentine and M. W. Pantoliano. 1981. "Protein-Metal Ion Interactions in Cuprozinc Protein (Superoxide Dismutase)," in T. G. Spiro, ed., *Copper Proteins*. Wiley-Interscience, New York, 291~358.

与辅酶 B_{12}相关的反应

G. Choi, S-C. Choi, A. Galan, B. Wilk, and P. Dowd. 1990. "Vitamin B_{12s}-Promoted Model Rearrangement of Methylmalonate to Succinate Is Not a Free Radical Reaction." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3714~3716.

D. Dolphin. 1982. B_{12}, Volume 1. Wiley, New York.
R. G. Finke and B. P. Hay. 1984. "Thermolysis of Adenosylcobalamin: A Product, Kinetic, and Co-C5′ Bond Dissociation Energy Study." *Inorg. Chem.* 23, 3041–3043.
R. G. Finke and D. A. Schiraldi. 1983. "Model Studies of Coenzyme B_{12} Dependent Diol Dehydrarase. 2: A Kinetic and Mechanistic Study Focusing Upon the Cobalt Participation or Nonparticipation Question." *J. Am. Chem. Soc.* 105, 7605–7617.
M. K. Geno and J. Halpern. 1987. "Why Does Nature Not Use the Porphyrin Ligand in Vitamin B_{12}?" *J. Am. Chem. Soc.* 109, 1238–1240.
J. Halpern. 1985. "Mechanisms of Coenzyme B_{12}-Dependent Rearrangements." *Science* 227, 869–875.
D. C. Hodgkin, J. Kamper, M. Mackay, J. Pickworth, K. N. Trueblood, and J. G. White. 1956. "Structure of Vitamin B_{12}." *Nature* 178, 64–66.
J. M. Pratt. 1972. *Inorganic Chemistry of Vitamin B_{12}*. Academic Press, London.

第 12 章　金属性质对蛋白质特定功能的调控

12.1　基本概念
12.2　蛋白质侧链对功能的调控：开放配位位点
12.3　配体类型对功能的调控
12.4　配位位点几何构型对功能的调控：铜蓝蛋白
12.5　间接因素对功能的调控
12.6　底物特异性
12.7　偶合过程

依照蛋白质环境之不同，含相似金属基的非朊基可以呈现迥然不同的功能，金属核心配位数的变化可用以调控电子的转移、底物的激活及配体的结合状态。通过对氨基酸侧链给体原子的选择，或配位构象的扭曲，或更间接地调节疏水性、氢键及活性部位的局部介电常数，使氧化还原电位得以被调节。对电子转移的调控可以通过与底物结合获得，而无需经金属结合使活性部位构象变化来调节。由氨基酸侧链形成的"口袋"能特异地转运反应物，从而决定了底物特异性。含一个以上非朊基的蛋白质通过多个偶合步骤从而加速特异性反应，或使一些难以进行的复杂反应得以进行。

12.1　基 本 概 念

讨论至此，我们已经认识到金属离子可以承担多项生物学功能。本章我们将阐明一个重要概念，即根据其在不同生物学环境中的反应特性，同一个金属单元可以行使不同的功能。关于金属蛋白内金属核的调节是生物无机化学中最为有趣的主题之一。在电子传递反应中，蛋白质的特定配体和局部介质中具有静电特性的非配位氨基酸在金属氧化水平上可对于给定电荷的氧化还原电位进行调节。通过偶合多个金属非朊基，蛋白可通过多个环节以加速特定的反应，或使一些难以进行的化学反应得以进行。对于原子或基团转移的反应，金属酶的活性中心可以通过邻近蛋白链的折叠形成精巧的空间选择性、疏水性、亲水性、及过渡态结构，从而使得反应速率显著提高。通过加入不同的金属离子到脱金属蛋白质中，人们发现占据配位位点的金属离子的性质也很重要。这些性质对于那些致力于模拟简单酶促反应（如酯或肽水解）的反应速率及反应特异性的仿生化学家来说是必须熟知的。

一个简单原理是，酶与底物结合可以导致负责催化的金属离子活化，比如通过改变其氧化还原势等。这种现象能对多个化学反应步骤施行严格的时序性控制。在上述例子中，对氧化还原势的控制可以避免过早的电子转移。另外，金属位点氧还势的变化常常伴随着几何结构的重排，导致提供配位氨基酸残基的蛋白链结构的精细调节。这些变化反过来又可以调节蛋白的其他功能属性。在多亚基蛋白中，如血红蛋白中，O_2 与血红素辅基结合引起的空间和电荷方面的变化又影响着 O_2 与其他亚基的结合，这种行为是自然界所设计的最精细的生物无机调控机制之一。为了实现生物学上的一些更为困难的转化过程，如从氮到氨的六电子还原及水的四电

子氧化偶合形成氧气，自然界已经制备了一系列起协调作用的含金属的生物分子。这些分子常常分布在膜上，或作为多聚蛋白配合物的一部分，这里多聚配合物的蛋白表面间的相互作用可以引起一定的微调(tuning)，经由多肽的构象变化最终传递到活性金属核心。

生物无机化学家早已知道，蛋白质可以调节金属核心的特性。由于已知的含金属的生物分子与其他小分子在光谱学及其他一些性质上的差异，在 20 世纪 60 年代末就有人提出金属酶可以表现一种张力态(entatic state)，即一种"比传统意义上的稳定分子更接近于单分子过渡态"。这个观点激起了许多探讨和研究，接下来的实验结果表明：具有特殊光谱性质的许多蛋白质中存在无伸缩性的金属核心，但此金属核心却不具有当时已知的所有的小分子性质，比如铜蓝蛋白和转铁蛋白就是其中两个例子。生物无机化学家合成的精确模拟模型显示一些相对简单的配体可用于再现这些金属核心的光谱学特性，及在一些适宜的环境下的反应性。因此，一些蛋白质尽管表面上符合上述张力态的定义，其中的多数仍然需要选择合适的金属核心才能完成所需功能。当金属核心可以实现不止一种功能时，调节蛋白质周围环境则可以对其进行必要的控制。本章就着眼于这样的体系。

12.2 蛋白质侧链对功能的调控：开放配位位点

蛋白质对结合的金属离子或含金属的辅基进行调控的最基本的要素之一就是其开放的配位位点数目，限制潜在的蛋白配体的结合部位可以实现对配位位点数的控制。以此方式，一个无机生物基团，如金属卟啉或铁硫簇，就可以实现以下两种不同的基本功能：作为一个简单的表面电子载体，或者作为一个底物结合及潜在的激活位点。本节将讨论几个这方面的例子。

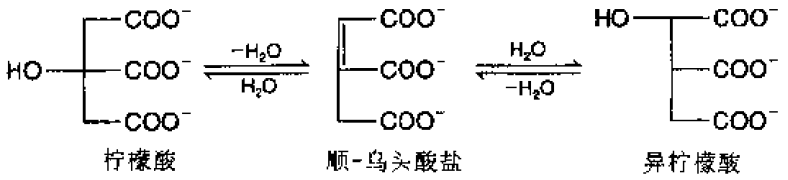
12.2.a 血红蛋白

在第 9 章中，我们已经讨论了细胞色素 c，该蛋白质提供了两个轴向的配体(一个组氨酸和一个蛋氨酸)来完成在氧化态及还原态铁卟啉中都存在的八面体配位结构。细胞色素 c 显然是一种高效的单电子载体，而没有底物结合和催化活性。另一个类似的例子是哺乳动物细胞色素 b_5，它同样含有在氧化态及还原态下都被两个轴向配体(两个组氨酸)配位的血红素。在早期的一项运用定点突变技术对含血红素蛋白进行的研究中，细胞色素 b_5 中的一个参与配位的组氨酸(His-39)被替换成了蛋氨酸，希望由此获得与细胞色素 c 相似的金属核心。对突变蛋白的光谱学和反应性的研究表明，替换上去的蛋氨酸或者不参加与铁离子的配位，或者很容易被其他配体所取代。在二价铁的状态下，组氨酸作为第六个配体，突变蛋白可以和一氧化碳形成稳定的配合物。而在三价铁的状态下，突变蛋白可以催化依赖过氧化氢的二甲苯胺去甲基化反应，该性质是母体蛋白所不具有的。这些实验证明，构建一个新的配位位点可对金属卟啉基产生巨大的影响。用在一个只作为氧化还原成员的蛋白质中，血红素不应该含有开放的配位位点，因为伴随着氧还态的改变，其结构变化会增大配位位点的重组能，从而抑制或者至少延缓了电子转移。反之，对一个具有配体结合或催化功能的蛋白质来讲，一个开放的配位位点则是必不可少的。

12.2.b 铁-硫蛋白(顺)乌头酸酶

在第 9 章中我们也详细讨论了铁-硫簇在电子转运蛋白中的应用。Fe_2S_2 和 Fe_4S_4 基团都可以实现生物界广泛存在的快速、可逆的氧还反应。最近新发现了一类酶，其所含的铁-硫簇被

用作非氧还反应的催化剂，特别是发挥水化和脱水酶的功能。在这一类酶中，研究得最透彻的是铁-硫蛋白(顺)乌头酸酶(aconitase)，该酶催化柠檬酸和异柠檬酸之间通过中间产物顺乌头酸盐 (aconitate) 进行的立体异构的相互转换。该反应是三羧酸循环中一个重要的步骤，如式 12.1 所示：



(12.1)

控制 Fe_4S_4 中心的反应性(即在电子传递或水化/脱水化反应过程中)的关键是 Fe_4S_4 形成的铁硫立方体的一个角是否留有空余的配体结合位点。

最近对于铁-硫蛋白(顺)乌头酸酶-异柠檬酸配合物和铁-硫蛋白(顺)乌头酸酶-异柠檬酸胺(一种抑制剂)配合物的 X 射线晶体结构分析，为我们提供了深入了解这种催化机制的机会。与含 Fe_4S_4 核心的铁氧还蛋白不同，在铁-硫蛋白(顺)乌头酸酶的铁硫立方体的 4 个铁离子中，只有 3 个与半胱氨酸硫酯配位(图 12.1)。

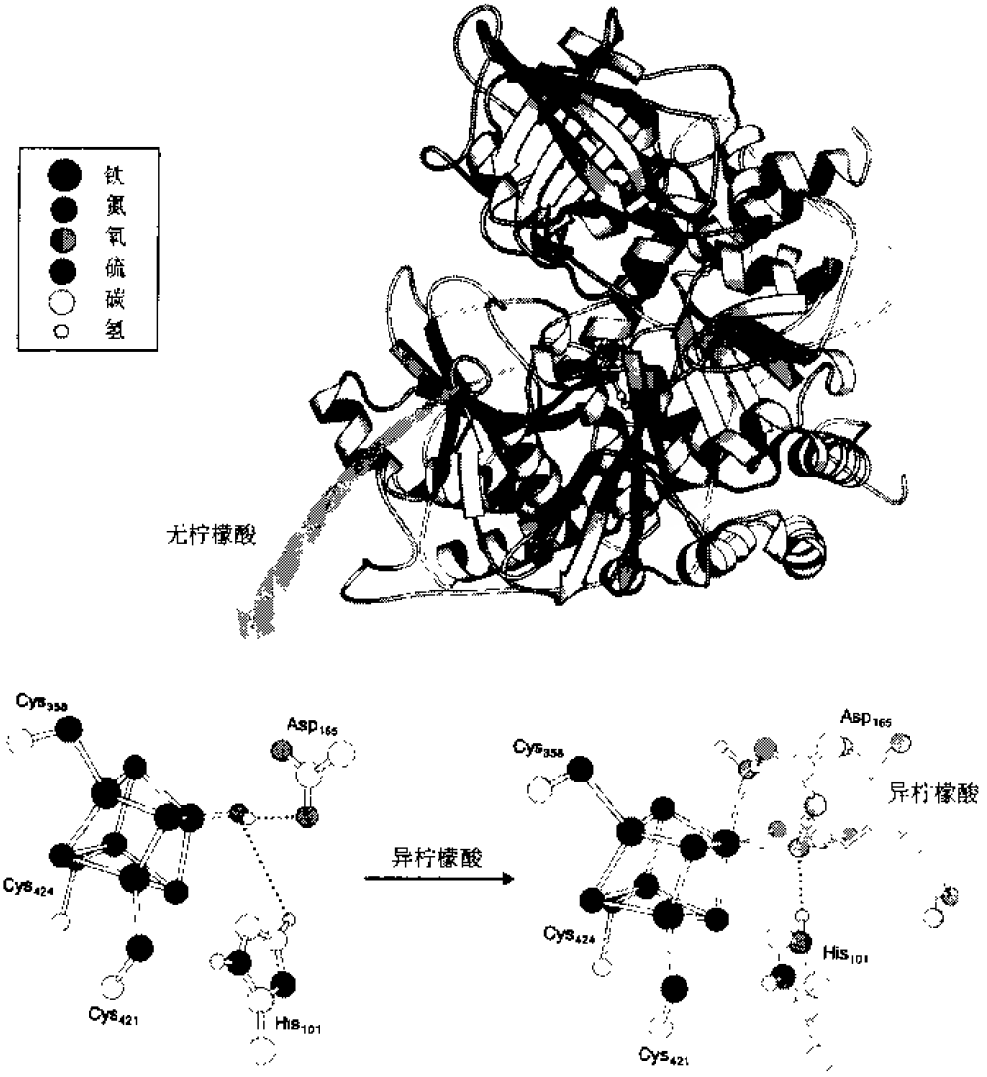


图 12.1　乌头酸酶的晶体结构显示了它与底物游离时和结合时的金属巯基簇

在酶处于静息态下，该剩余的铁离子结合一个氢氧根离子，此氢氧根离子被用作邻近的一个组氨酸残基(His-101)的氢键受体和天冬氨酸残基(Asp-165)的电子供体。与该铁硫簇中其他铁离子一样，这个铁离子核心具有扭曲的四面体，四配位结构。当结合了底物之后，氢氧根离子质子化形成水配体，并且铁离子通过与底物的 2 个氧原子形成螯合环使配位数变为六。因此，酶系统就通过丝氨酸-642 醇盐或酚盐(alkoxide)对活化的异柠檬酸 Cβ—H 键的攻击，进而切断 Cα　OH 键，完成脱水反应。上述机制的细节见图 12.2 所示。

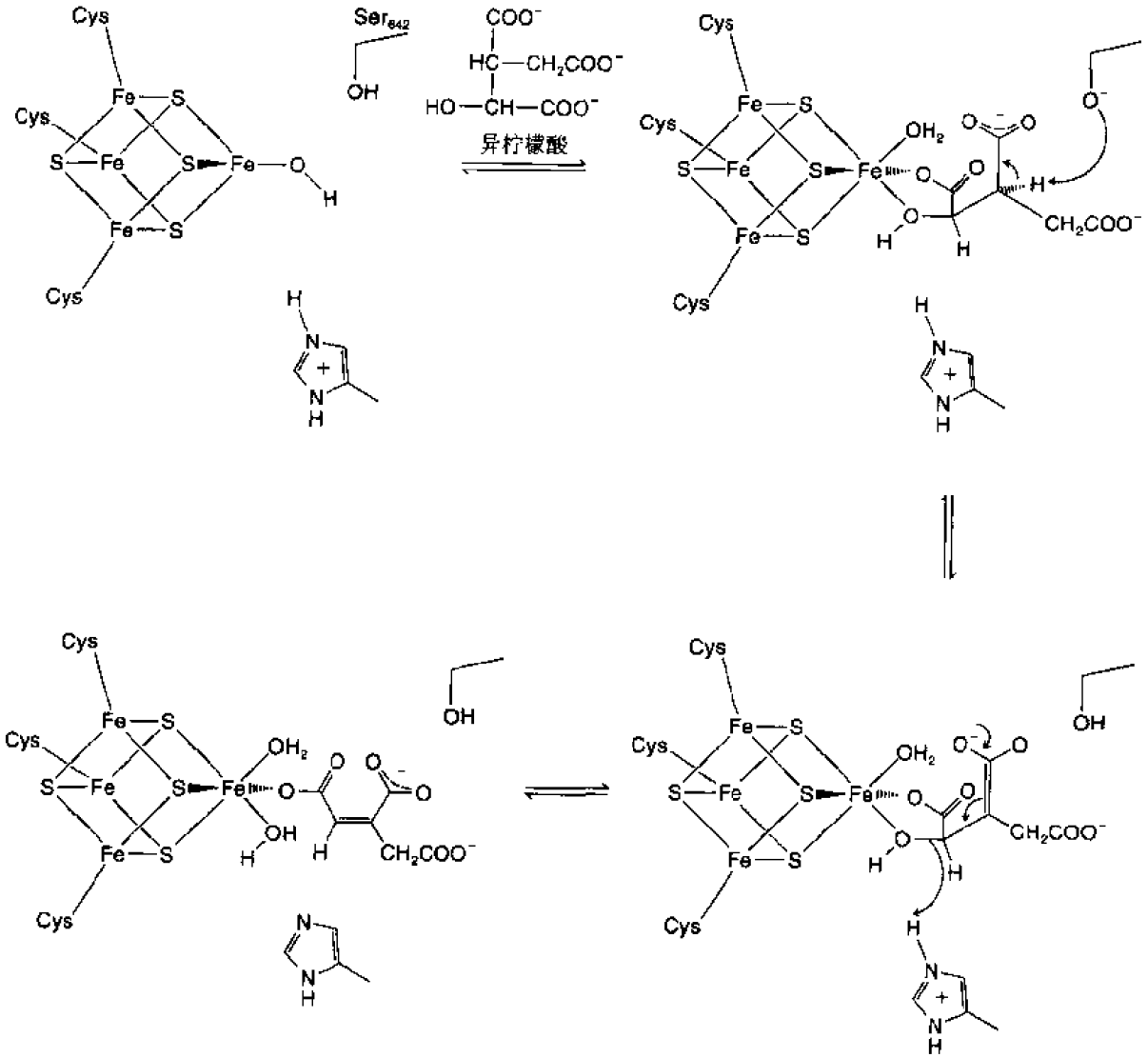


图 12.2　在乌头酸酶活化部位，异柠檬酸向顺乌头酸酯(aconitate)转化的机制图解

显示着铁的配位域从四配位到六配位的扩展

在(顺)乌头酸酶中的具有催化活性的离子在酶促循环中没有氧还变化，而且在其他的许多方面都很类似于第 10 章中所述的锌酶。水或氢氧根离子在没有底物存在时与金属结合。氢结合基团(此例中即 3 个组氨酸和一个天冬氨酸残基)广泛地用于形成活性位点，以结合和定位反应底物。羟基和羰基氧原子与铁-硫立方体顶角上的三价铁离子的配位以激活底物，经蛋白上某一适当位置氨基酸的作用而除去质子，最终导致反应产物的形成。在(顺)乌头酸酶中两

种金属核心间化学上的不同点是，铁配位数在静息态酶的四配位与结合了底物的酶的六配位之间循环，而锌酶中的锌离子则通常保持四配位或五配位。也许这种配位数的可变性就是自然界为什么选择(顺)乌头酸酶中铁硫中心的一个角的原因之一。

最后，回忆一下在 6.2.b 中提到过的离子应答元素结合蛋白(IRE-BP)便可知晓，它就是一种胞质中的(顺)乌头酸酶。离子可逆地与该蛋白的脱辅基形式结合过程和调节离子水平的细胞机制都进一步阐明了通过蛋白侧链的选择来调控蛋白质功能。如果所有这些活跃离子都与半胱氨酸以硫酯键配位，则 IRE-BP 和(顺)乌头酸酶的功能都不可能实现。

12.2.c 锌蛋白

如前几章中所述，蛋白质中的锌可能具有重要的结构及催化功能。区别这两种功能的一个主要特征是，催化性的锌核心总是存在一个开放的配位位点，而结构性的核心却不存在这样的位点。此外，两种类型的锌核心在所结合的配体种类方面还存在另外一些显著的差别。例如，在第 7 章中我们讨论了核酸结合蛋白中的结构性锌核具有[Zn(Cys)$_4$]、[Zn(Cys)$_3$(His)]、[Zn(Cys)$_2$(His)$_2$]及[Zn$_2$(Cys)$_6$]。而第 10 章中我们描述了具有[Zn(His)$_2$(Glu)(OH$_2$)]、[Zn(His)$_3$(OH$_2$)]及[Zn(Cys)$_2$(His)(OH$_2$)]的催化位点。从结构位点来讲，每一锌原子的正四面体配位域都被蛋白配体所饱和。两个或更多的半胱氨酸配体的存在使锌的配位数不太可能大于 4，即排除了它底物结合及激活的能力。反之，对催化性的锌核来讲，静息态酶中的一个配位位点被水或氢氧根所占据，在反应中直接起作用或被底物取代，或兼有两种功能。

12.3 配体类型对功能的调控

如第 3 章中所述，许多金属蛋白的活性位点都含有作为生物无机功能团的金属与有机辅因子的配合物或金属簇。这些基团都是半自主的单元，其许多性质都由单元本身所决定。另一方面，由于它们是被蛋白侧链所提供的一个或多个与金属配位的配体固定在一定的位置上的，这些配体的存在提供了一个途径来调控这些基团的性质以优化特定的功能。

12.3.a 血红蛋白

在第 11 章中，我们已讨论了几种血红素被单个的蛋白侧链配体所配位的例子，这些例子包括肌球蛋白、血红蛋白、细胞色素 *c* 过氧化酶(His 作为配体)、细胞色素P-450、chloro-过氧化酶(Cys 作为配体)、过氧化氢酶(Tyr 为配体)。虽然除了其轴向配体不同外，这些蛋白还有其他许多不同点，但它们与轴向配体的性质密切相关，趋向于直接被配位的一个特征是其二价铁形式的稳定性。因此，对于肌球蛋白和血红蛋白来讲，它们必须避免其铁离子被氧化成热力学稳定然而却是无活性的三价铁形式。在此处组氨酸配体被用于组成卟啉-铁-轴向配体结合体，从而使得铁离子在+2 价时整个结合体处于净电荷为零的状态。对于那些在静息态中铁离子是(或机理上应该是)+3 价的酶，轴向配体就是阴离子的酪氨酰或半胱氨酰，此时当铁离子处于+3 价时获得电荷中性。

我们已经讨论过的两个实验结果可说明此概念。一个是通过使用定点突变技术，肌球蛋白中与铁离子结合的组氨酸被替换为酪氨酸。突变蛋白的光谱性质符合酪氨酰与铁离子配位的结构。突变蛋白极易自动氧化。在室温下暴露于氧气中的突变蛋白被氧化为无活性的三价铁状态，而不是形成双氧配合物。

另一个例子是将细胞色素 c 中的轴向蛋氨酸配体替换为半胱氨酸。对于此蛋白来说，应用所谓“半合成”(semisynthosis)技术可与定点突变获得相同的结果。用溴化氰处理马心细胞色素 c 导致蛋白在 Met-65 和 Met-80 处断链。包含 1～65 号氨基酸结合血红素的大片段就分开了，这个断链反应将 Met-65 转化成了高丝氨酸内酯(homoserine lactone)残基。分离含血红素的大片段(aa1-aa65)，与设计合成的 66～104 肽链连接，加入肽链的氨基打开 aa65 的乳酮环而形成一个新的肽键。该方法的具体流程见图 12.3。

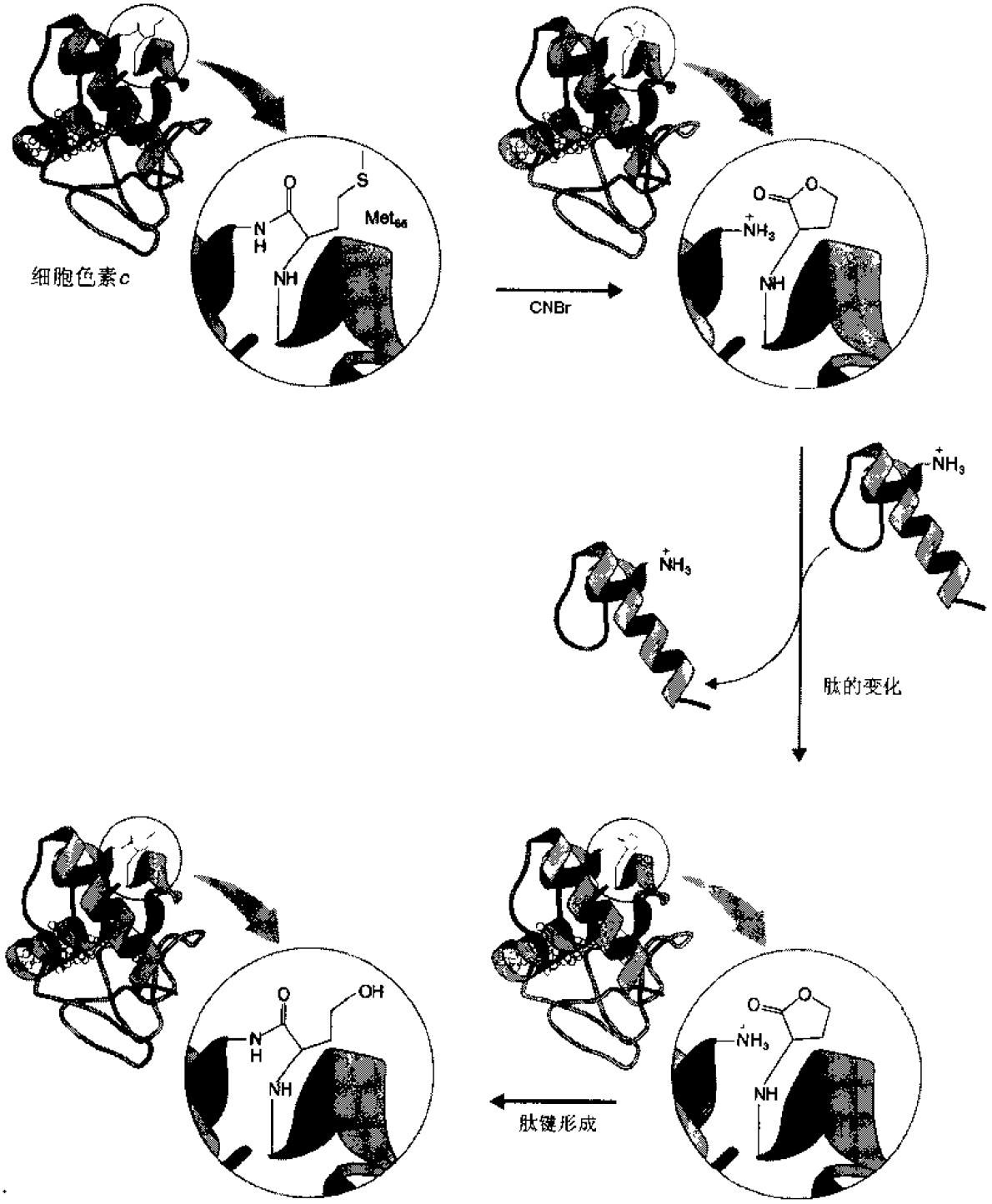


图 12.3　通过半合成制备细胞色素 c 衍生物的流程图

由此我们就得到了 Cys 取代 Met 的突变蛋白。此突变蛋白的三价铁氧化形式具有与含 Fe^{3+} 的细胞色素P-450非常类似的吸收光谱性质。但在还原条件下，突变蛋白的光谱性质并不类似还原的细胞色素P-450，而是与含 Fe^{2+} 的细胞色素 *c* 类似。这说明在还原的突变蛋白中Fe—S键被切断或质子化了。突变蛋白的还原势为－390 mV，而天然蛋白为＋262 mV。还原势的巨大变化和 Fe—S 键的不稳定性都反映了血红素核心保持电中性的重要性，同时也说明了轴向配体的改变对金属离子的性质具有显著的调控作用。

12.3.b 铁-硫蛋白：Rieske 中心

我们在第 5 章和第 9 章中都讨论过，铁-硫簇一般通过末端的半胱氨酰配体与蛋白相连。比如，Fe_2S_2 类型的核心就通过 4 个半胱氨酰键形成[Fe_2S_2(S-Cys)$_4$]簇。这些单元从含有 2 个三价铁离子的氧化态(此时整个簇的净电荷为－2)开始氧还反应，转变到含有一个三价铁离子和一个二价铁离子的还原态(净电荷－3)，反应的氧还势在－0.23～－0.45 V 之间。在线粒体和叶绿体的电子传递链中存在一种新的中心叫做 Rieske 中心。这种中心具有高得多的氧还势，通常在－0.15～＋0.35 V 之间，但多数趋向于具有较高的值。尽管在氧还势方面与其他铁硫簇有着较大的差别，Rieske 中心的光谱结构表明它们同样含有 Fe_2S_2 核心。虽然至今还没有得到过含 Rieske 核心的蛋白的晶体结构，但通过对来源于假单胞菌属(*Pseudomonas cepacia*)的磷苯二甲酸(phthalate)脱氧酶的详细研究已经使我们对此类蛋白有了一定的了解。首先，对特殊的 ^{14}N 和 ^{15}N 标记的蛋白使用 ENDOR 光谱技术显示，该中心的一个铁原子与两个半胱氨酰配位，另一个铁原子与两个组氨酰配位，形成如图 12.4 所示的结构。

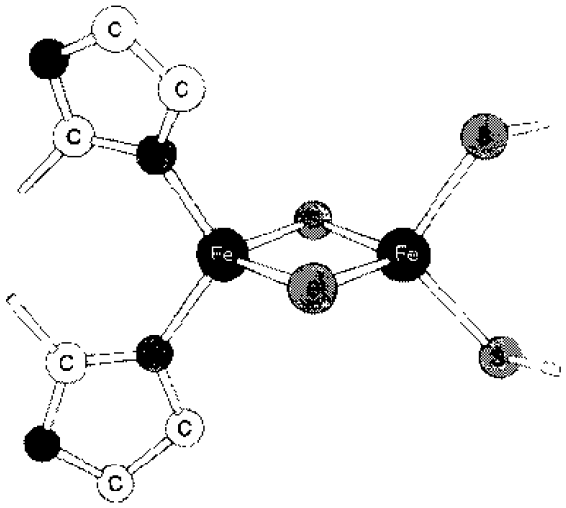


图 12.4 通过组氨酸和半胱氨酸配位的铁硫簇的 Rieske 中心结构

2 个组氨酰的存在导致了 Rieske 中心中的 Fe_2S_2 核心的高氧还势。供体氮稳定了二价铁，而不是氧化态的三价铁；组氨酸配位的中心具有较低的电荷，从而进一步稳定了其低氧化状态。蛋白从含 2 个三价铁的氧化态(此时[(Cys)$_2$$Fe_2S_2(His)_2$]净电荷为 0)还原为含一个三价铁和一个二价铁的还原态，导致整个簇的净电荷为－1。因此，对血红素和这些双核铁硫中心来说，从属配体的选择提供了一个对氧还势进行粗略调控，从而实现某些功能的手段。精细调控可以通过其他的一些手段获得，我们将在后面章节中讲述。

12.4 配位位点几何构型对功能的调控：铜蓝蛋白

除了决定某个金属位点的配体选择外，蛋白在某种程度上还可以决定配位位点的立体结构。这种控制机能要求，除了金属离子配位的影响外，还要有其他的结构成分使得蛋白框架足够稳定。目前我们了解最透彻的具有这种控制机能的例子就是铜蓝蛋白的质体蓝素(plastocyanin)。如前所述，早先铜蓝蛋白被认为是张力态(entatic state)的一个例子，这是因为它具有与任何简单含铜复合体所不同的 EPR 和可见光谱特性。然而后来发现(如 9.1.b 节中所述)，

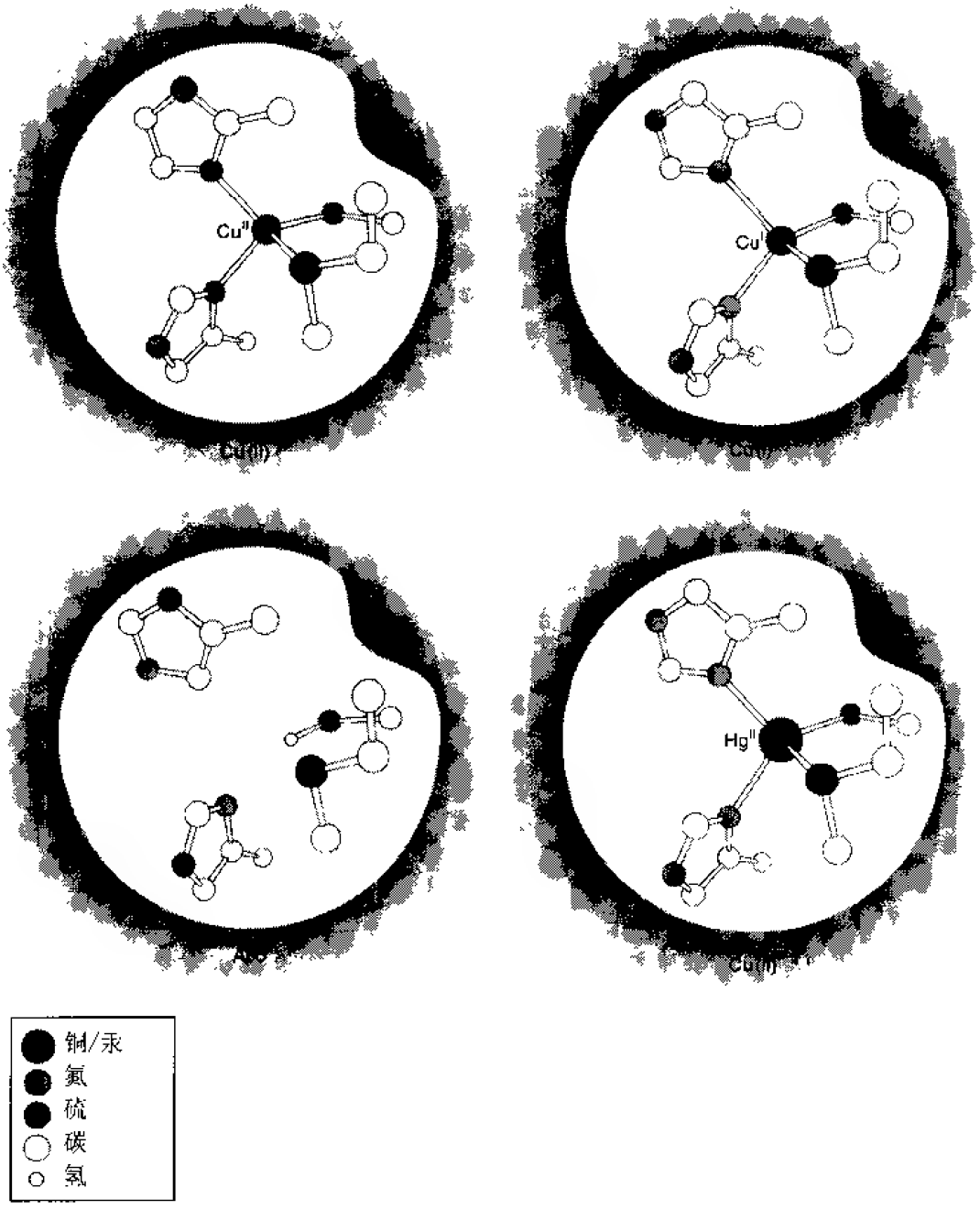


图 12.5 铜蓝蛋白质体蓝素活性位点的结构

氧化态(左上)，还原态(右上)，脱配体态(左下)，Hg(Ⅱ)衍生态(右下)

它的许多光谱性质是由于含有半胱氨酸硫酯与 Cu^{2+} 的配位而来的。尽管如此，另外发现的一些事实却表明，正如最初的假设，铜蓝蛋白也许代表着一种 entatic 态。多数四配位的 Cu^{2+} 复合体具有正方形结构，而相应的 Cu^{+} 复合体则是四面体结构。因此包含这样两种结构之间相互转化的氧还反应的过渡态就应该具有一种中间结构，从而避免因为明显的结构变化延缓了可逆的电子转移反应速率。但是对氧化态和还原态的质体蓝素结构进行分析，结果表明伴随着氧还反应事实上只有极小的结构变化，正如我们在第 9 章中讨论过的一样，它的氧化态和还原态都具有一种扭曲的结构。

这个发现可以有两种解释。一种可能是，在这样一套配体环境里，铜离子实际上在两种氧化态下都趋向于这样一种中间结构。但这种解释很难得到直接的实验证实，因为硫酯很容易氧化，我们很难得到无构象限制的配合物。另一种解释是，蛋白的构象限制使金属配合物具有这种结构。有实验结果很支持这种假设：脱辅基蛋白和汞取代蛋白都具有与铜蛋白几乎同样的结构，如图 12.5 所示。因此，质体蓝素的配位结构很可能是由蛋白所决定。这种对铜配位位点的立体结构进行的调控可以减小氧还反应的结构重组能，并优化蛋白的生物学功能。

12.5 间接因素对功能的调控

以上的例子显示了与金属离子直接结合的配体如何被用来调控蛋白的氧还性和配位性质。然而，对许多系统来讲，金属中心的组成和立体结构及其蛋白衍生出的配体具有同一性，但其功能可有很大的不同。此时，折叠的蛋白链的其他一些属性起着调控金属核心的功能，从而使之有效地完成应有的生物学功能。

12.5.a $[Fe_4S_4(Cys)_4]$中心：疏水性与氢键作用

这种调控的一个最有趣的例子是铁-硫蛋白。细菌的铁氧还蛋白的氧还反应在极低的势能态下进行（≈ -400 mV），然而高势能铁蛋白（high-potential iron proteins，HiPIP）的氧还势却非常高（$\approx +350$ mV）。早期的晶体结构分析表明，这两种蛋白都含有$[Fe_4S_4(Cys)_4]$核心（见第 5 章，第 9 章）。这个发现显然带来一个矛盾：为何两种具有同样活性中心的蛋白却有如此不同的氧还势？经过比较这两种蛋白与一些已知结构蛋白的光谱学性质发现，两种蛋白使用了不同的氧还对，如反应式 12.2 所示：

$$\underset{\text{（铁氧还蛋白）}}{Fe_4S_4(Cys)_4^{3-}} \rightleftharpoons Fe_4S_4(Cys)_4^{2-} \rightleftharpoons \underset{\text{（高势能铁蛋白）}}{Fe_4S_4(Cys)_4} \qquad (12.2)$$

尽管这个发现可以解释为何两种有相同活性中心的蛋白氧还势相差 750 mV，但它却不能解释某个特定的蛋白为何选择这种氧还对而不是那种。对晶体结构的更精细的分析发现两种金属核心所处环境有许多不同点，这些不同点可能调控着蛋白的氧还势，并决定使用哪一种氧还对。

主要的区别在于配位位点的总疏水性和肽 NH—S 氢键的数目。疏水性的环境适应稍高电荷的中心$[Fe_4S_4(Cys)_4]^{-}$，因而支持 HiPIP 氧还对。反之，肽 NH···S（硫化物或半胱氨酰）氢键可以帮助中和金属核心带的负电荷（见 8.2 节），这种作用对于簇的较多负电荷形成以帮助稳定还原性铁氧还蛋白来说很重要。以上这些推论与观察的结构差异非常符合，铁氧还蛋白中环境的疏水性较低，金属核心更多暴露在溶液中。另外，这些位点中每个簇分别含有 8～9 个 NH···S 氢键，而 HiPIP 只有 5 个。细菌铁氧还蛋白中的一个金属簇的氢键分布如图 12.6 所

示。疏水性和氢键的相对重要性还不能确定。已经明了的是，这些效应足以有效地调节氧还势使氧还对到达特定区域，使蛋白在一定的生理条件下能有效完成电子转移的功能。

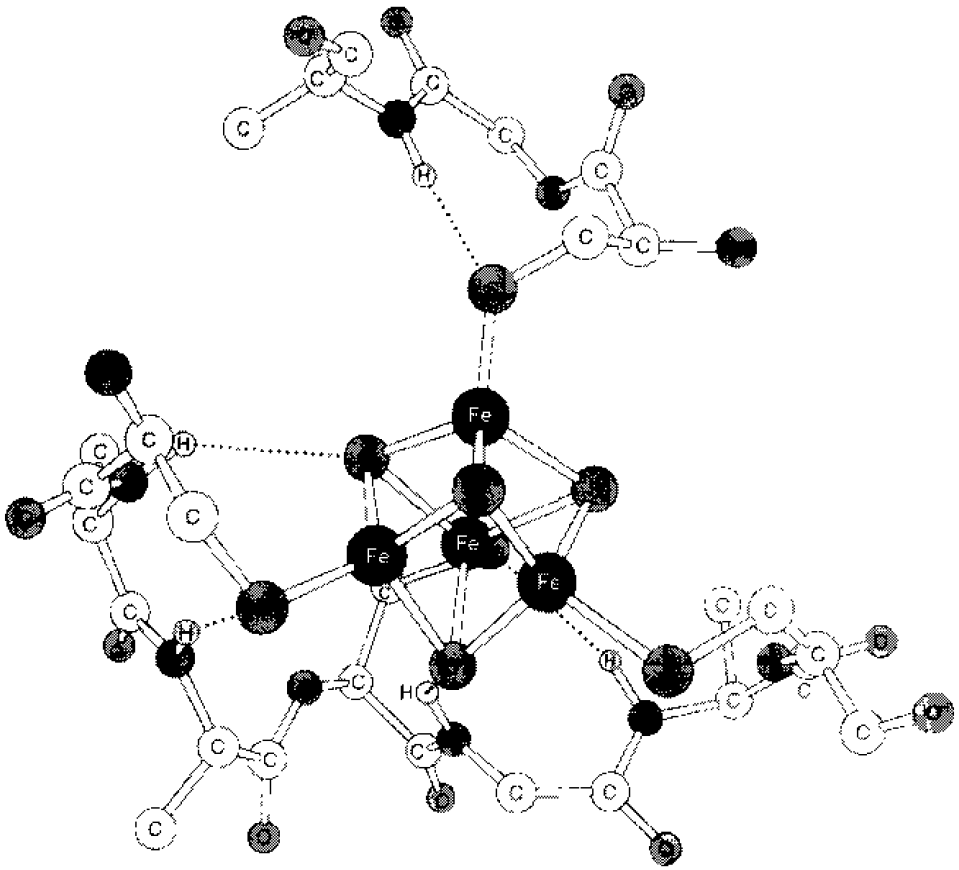


图 12.6　氧还蛋白的铁-硫簇周围一些肽的 NH 与硫氢键

12.5.b　细胞色素中的静电势

在第 9 章中我们已经知道，蛋白中金属核心的氧还势极大地依赖于配体的组成及质子化状态。另一个调控电子载体的氧还势的机制是带电荷氨基酸残基在蛋白表面的分布。表面残基电荷与金属核心电荷的相互作用符合库仑定律：电荷相互作用能与氧还中心到电荷基团间距离成反比，与基质的有效介电常数成正比。介电常数与蛋白残基和蛋白所处溶液有关。如果没有水溶液的高介电常数的屏蔽，表面电荷的调控效应将会非常巨大。由于有水的影响，静电势效应远小于前面讨论的与金属直接结合的配体的效应，但它仍然在匹配 2 个电子转移蛋白的反应势的精细调控中起着重要的作用。

用遗传学改造过的哺乳类细胞色素 b_5 证明带电基团在对氧还势的调控中起的作用。用半胱氨酸修饰过的金电极测量野生型蛋白和一系列突变蛋白的氧还势，突变体包括谷氨酰胺取代谷氨酸，天冬酰胺取代天冬氨酸，及其他一些中和酸性氨基酸的突变。野生型蛋白对 NHE 的氧还势是 -7 mV，突变体的氧还势从 -13 mV（一种 Ser-Asp 突变）到 $+13$ mV（中和三中酸性氨基酸的三突变体）。以计算机蛋白晶体模型为基础，假设周围的溶剂分别有高介电常数（$\varepsilon=80$）或低介电常数（$\varepsilon=2\sim4$），对所得的数据进行拟合，如图 12.7 所示。拟合的精确性说明，表面电荷可以通过这种静电机制来有效地实现对氧还势的调控。

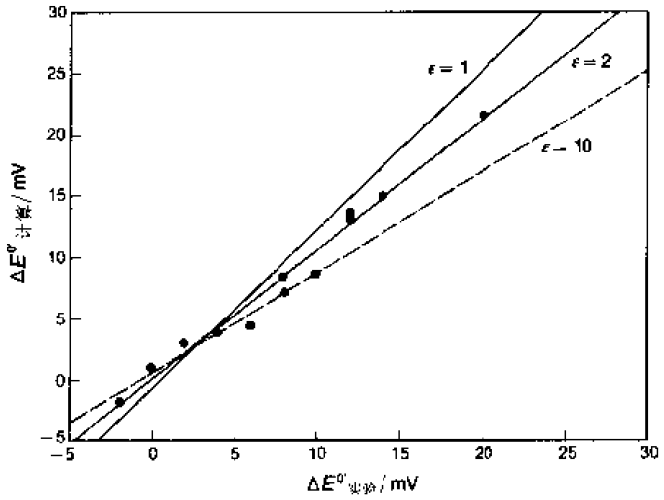


图 12.7　突变的细胞色素 b_5 测定的氧还势与蛋白内部的假定不同介电常数的校正值的比较

数据的线性拟合提示介电常数在 2～4 范围内实验结果最佳[依据 K. K. Rodgers and S. G. Sligar, *Journal of the American Chemical Society* 113, 9419～9421 (1991)]

12.6　底物特异性

以上的讨论阐明了金属位点本身如何被调控以获得一定的功能。另一种水平的调控并不影响金属离子本身，而是调节了金属蛋白与其他分子的相互作用。这一特点使得由相同金属位点和配体构成的活性位点具有不同的功能。一个最好的例子就是金属蛋白酶对其底物的特异性。在此，含有同样金属核心的不同的酶可以结合和转化不同的底物，从而实现不同的功能。

12.6.a　蛋白酶

在第 10 章中，我们已经看到了含锌的羧肽酶 A 和嗜热菌蛋白酶(thermolysin)具有极为相似的活性位点，尽管这两种酶在结构和进化上都毫无关联。另外，这两种酶催化不同底物的水解。羧肽酶 A 是一种外肽酶，从肽链 C 末端切断肽键，该酶在 C 末端残基是芳香族氨基酸或大的疏水性氨基酸如苯丙氨酸或亮氨酸时活性最强。而嗜热菌蛋白酶是一种内肽酶，它从多肽链中间切断肽键，对切除位点两端的残基有不同程度的特异性。

这两种蛋白的晶体结构解释了它们各自的特异性如何构成。对羧肽酶 A 来说，从 Arg-145 开始的一些带正电荷侧链的残基形成末端羧基结合的口袋(图 10.2)。另外，它还有一个疏水性的结合末端残基侧链的结合口袋，所以羧肽酶 A 对疏水性氨基酸有一定的特异性。另一方面，嗜热菌蛋白酶具有一个在剪切位点旁延伸几个残基的结合口袋。用一系列含有

$$Gly-Leu{-}X \quad (\cdots\text{表示切割位点})$$

序列的抑制剂进行结合实验表明，当 X＝Leu 时的结合能力比 X＝—NH_2 时的强 2 个数量级。

另一个更直接的比较是羧肽酶 B。该酶与羧肽酶 A 高度同源(氨基酸序列同源性约 50%，四级结构十分相似)，然而却有不同的底物特异性。羧肽酶 B 对末端碱性氨基酸具有特异性，而不是羧肽酶 A 的疏水性氨基酸。此差异可以用结构比较来解释。在羧肽酶 B 中，对应于羧肽酶 A 的疏水性口袋的中心位置处是 Asp-255(图 12.8 所示)，该残基可能与正电荷侧链作用，以协助底物结合及接下来的切割反应。

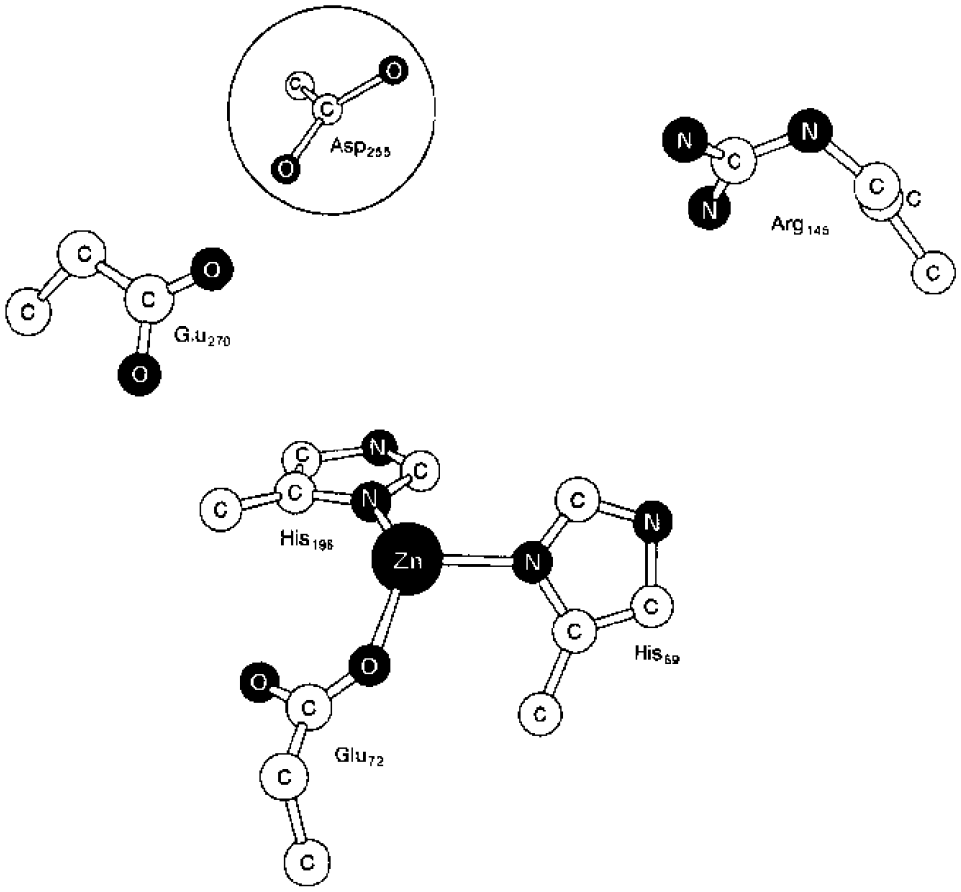


图 12.8　羧肽酶 B 结构的活性中心显示对 Asp-255 位的残基导致相邻的碱性氨基酸肽链的切割倾向

12.6.b　细胞色素 P-450

活性中心底物特异性调节的另一个例子是细胞色素 P-450。如第 11 章所述，该酶催化一系列的疏水性底物的水化。该酶家族成员众多，已发现 50 多种序列。据估计人的基因组中有大约 100～200 不同的 P-450 酶。已知一种来源于细菌的水化樟脑(camphor)的细胞色素 P-450的晶体结构。哺乳动物中该酶一般是结合于膜上的，所以很难纯化和结晶。序列比较分析表明，哺乳动物酶与细菌酶具有相同的基本结构，只是在氨基末端多出来了一段与膜结合有关的序列。但在细节上，该酶家族成员的序列仍有很大的不同。这种不同使得保守的铁卟啉催化位点周围的底物结合位点呈现多样性，从而每一种酶都能催化其自己的一套特异性底物。人们正在进行大量的研究以试图查明氨基酸序列、结合位点结构以及底物特异性之间的关系。

根据已知的樟脑酶的结构，一些被认为在决定底物特异性时起关键作用的残基位点如图 12.9所示。如果 P-450 控制底物特异性的机制能被查明，蛋白质工程学家就有可能设计合成出高区域选择性地氧化碳水化合物的酶。

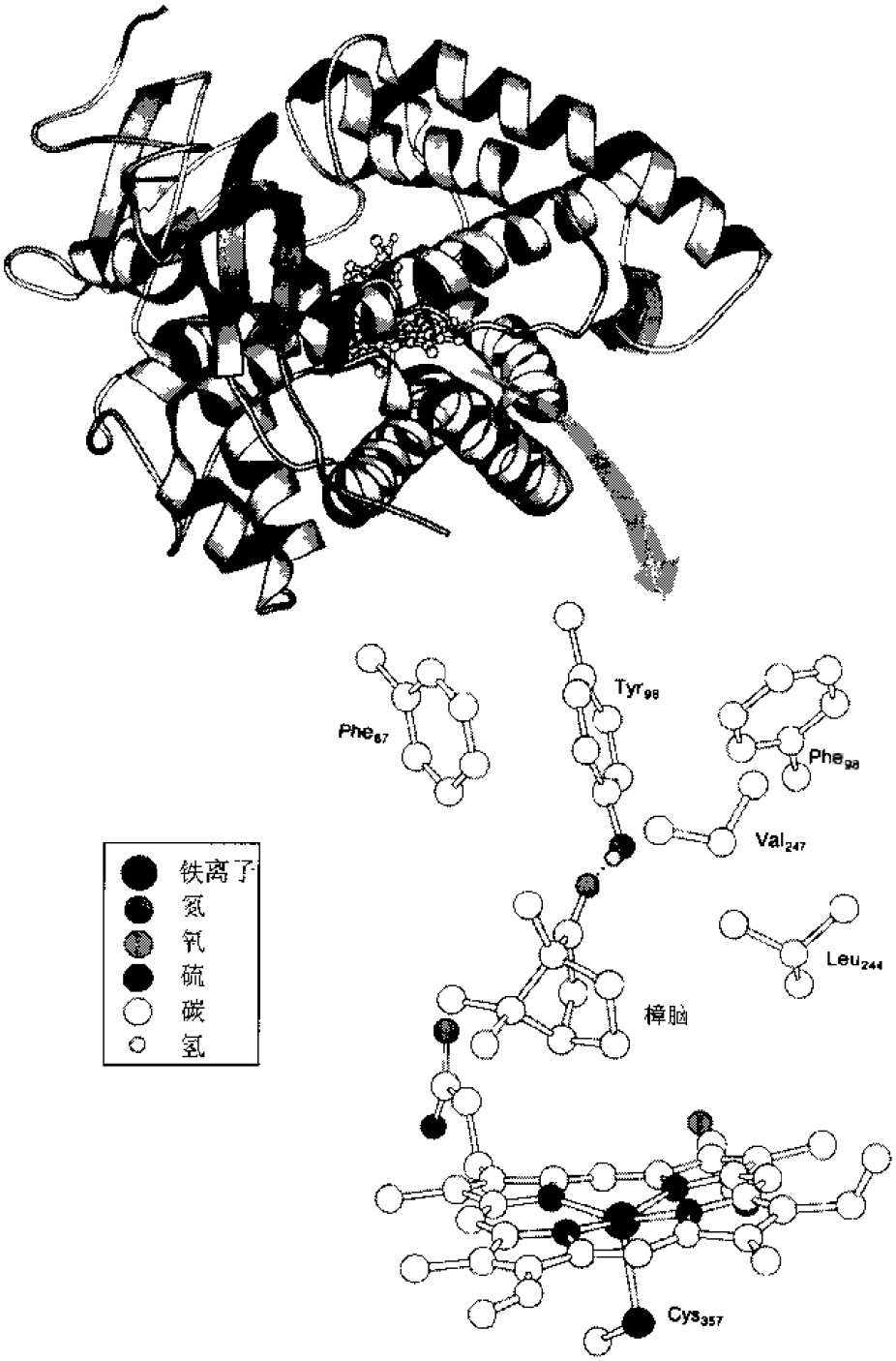


图 12.9　在决定底物特异性时起关键作用的残基位点

箭头所示，细胞色素 P-450 樟脑衍生物结构的血红素活性位点和疏水口袋通过与 Tyr-96 的氢键完成了底物在活性位点的定向

12.7 偶合过程

蛋白调控一个最重要的表现就是能偶合两个或多个反应过程的能力。这种偶合对于实现多电子氧还反应，转化不同形式的化学能，以及消除由于高反应性中间物的产生而导致的副反应尤为重要。事实上，没有这种偶合的话，许多基本的生物学过程都不可能发生。对于偶合的具体机制的了解仅限于少数几种系统，但这几种系统所采用的策略极有可能被其他许多系统采用着。

12.7.a 电子转移偶合：亚硫酸盐氧化酶

如第 11 章中所述，亚硫酸盐氧化酶是一种含有 Mo 辅基和 b 型血红素的酶。它催化方程 12.3 所示的反应：

$$SO_3^{2-} + 2\ 细胞色素\ c_{(ox)} + H_2O \rightleftharpoons SO_4^{2-} + 2\ 细胞色素\ c_{(red)} + 2H^+ \qquad (12.3)$$

其他电子受体如铁氰化物或氧气可以代替细胞色素 c。来源于鸡肝脏的硫化物氧化酶是一种分子量 120 kDa 的二聚体，每个亚基含有一分子 Mo 和一分子血红素。用蛋白酶消化此二聚体得到两个结构域：一个为含 Mo 的二聚体，单体分子量为 47 kDa；另一个为含血红素的单体，分子量 9.5 kDa。分离纯化的含 Mo 二聚体仍可以以铁氰化物或氧气为电子受体催化亚硫酸盐的氧化，但不再能以细胞色素 c 为电子受体。即使是将含 Mo 和含血红素的组分混合，或直接使用未经分离的酶解混合物，都不能恢复酶的依赖细胞色素 c 的活性。这说明，两种结构域之间的联系（由完整多肽链决定）对于偶合发生在 Mo 中心的两电子亚硫酸盐氧化反应和发生在血红素中心的两个单电子的细胞色素 c 还原反应是非常重要的。在前面的图 11.19 中归纳了总的反应机制和偶合现象。

12.7.b 化学变化和电子转移偶合：固氮酶

固氮酶还原分子氮成为氨。此双蛋白酶系统催化的总反应如方程 12.4 所示：

$$N_2 + 8H^+ + 16Mg\text{-}ATP + 8e^- \rightleftharpoons 2NH_3 + H_2 + 16Mg\text{-}ADP - 16Pi \qquad (12.4)$$

伴随每一个电子的转移，两分子 Mg 复合的 ATP（该反应的实际底物，见第 10 章）被水解。尽管偶合 ATP 水解和分子氮还原的细节机制仍有待于进一步阐明，人们已发现了几个一般的特性。首先，Mg-ATP 与铁蛋白结合，从而降低了还原势（≈100 mV）。我们以前也曾遇见过这种底物结合调控金属蛋白的氧还势的例子（细胞色素 P-450，MMO，见第 11 章）。氧还势的降低对于电子从铁蛋白到钼铁蛋白的转移是至关重要的。ATP 水解似乎与电子转移同时发生。伴随一个电子转移的两分子 ATP 水解反映了铁蛋白的二聚体特性。

固氮酶系统还是另一种偶合的例子。每一个氮分子的还原过程中，酶会消耗掉 8 个电子：其中 2 个电子用于产生一分子氢，另外 6 个电子都用于产生一分子氨。固氮酶反应的限速步骤是电子转移后铁蛋白和钼铁蛋白的分离。钼铁蛋白每次储藏一个电子，直到底物的还原可以发生。这种偶合一系列的单电子转移反应直到最后发生一个多电子还原反应的机制仍有待于阐明，但可以预料的是，该机制一定包含蛋白链对金属中心的协同调控。

12.7.c 底物结合：细胞色素 P-450

细胞色素 P-450 提供了一种化学偶合的好例子。如第 11 章中所述，从三价铁到二价铁（结合分子氧的形式）的还原并不在底物结合前发生。这种控制非常重要，因为系统必须一种反应性非常强的中间物，如果此中间物在底物结合之前形成，它就可能与酶反应并损坏酶或者形成短路浪费掉还原能。通过研究天然细菌来源的酶 P-450$_{樟脑}$对其天然底物樟脑（camphor，2-莰酮 $C_{10}H_{16}O$）或人工底物的作用及定点突变蛋白的性质，这种偶合的分子机制已被阐明。

未结合底物的 P-450$_{樟脑}$的晶体结构显示，酶的底物结合位点充满了水分子，包括一个水分子直接与铁配位形成的八面体低自旋 Fe^{3+}核心。当樟脑结合后，所有的水分子都被取代，并且铁的配位数降为 5。蛋白质通过范德华力与樟脑广泛接触，另外还有一个与樟脑的氧原子形成

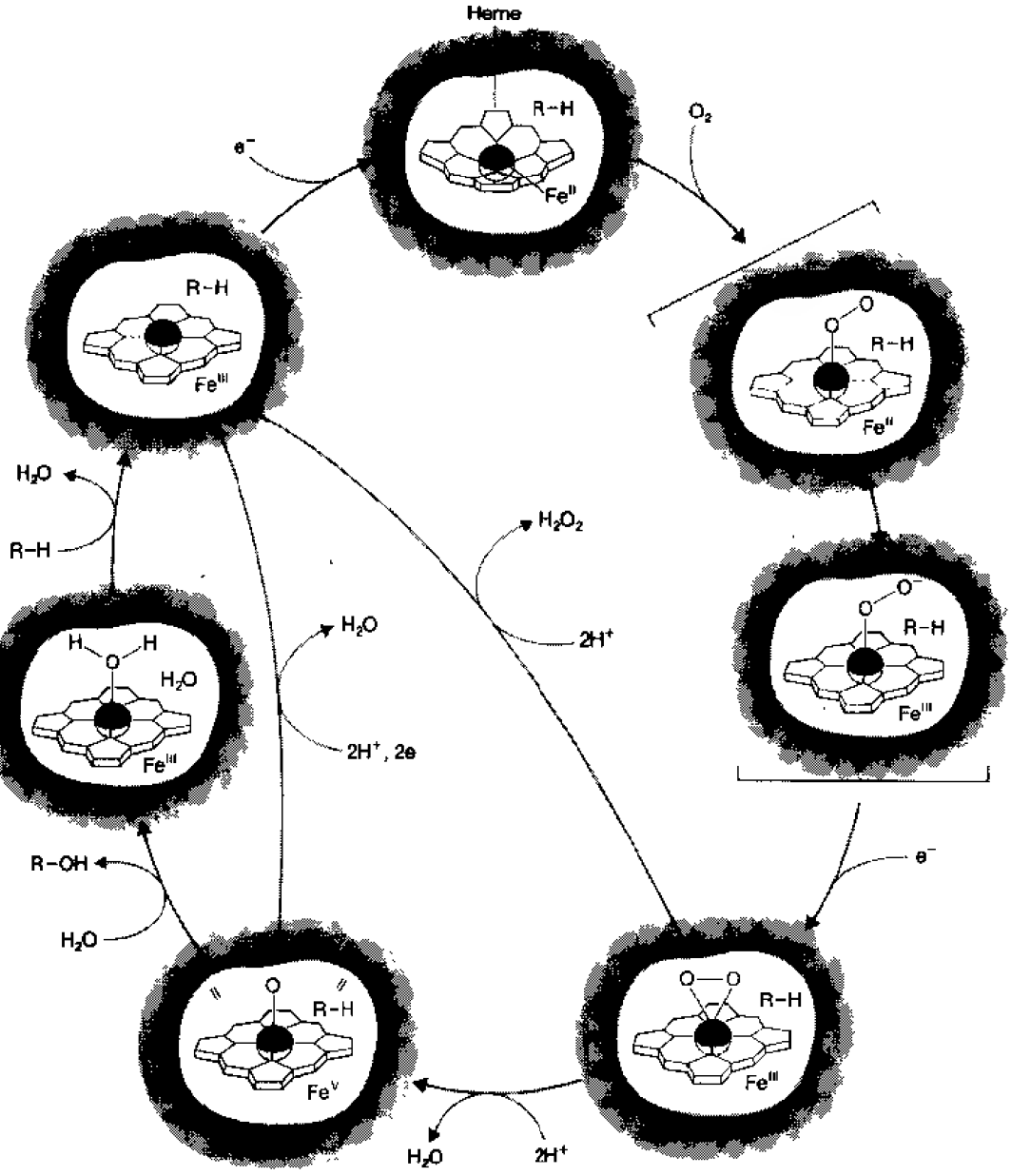
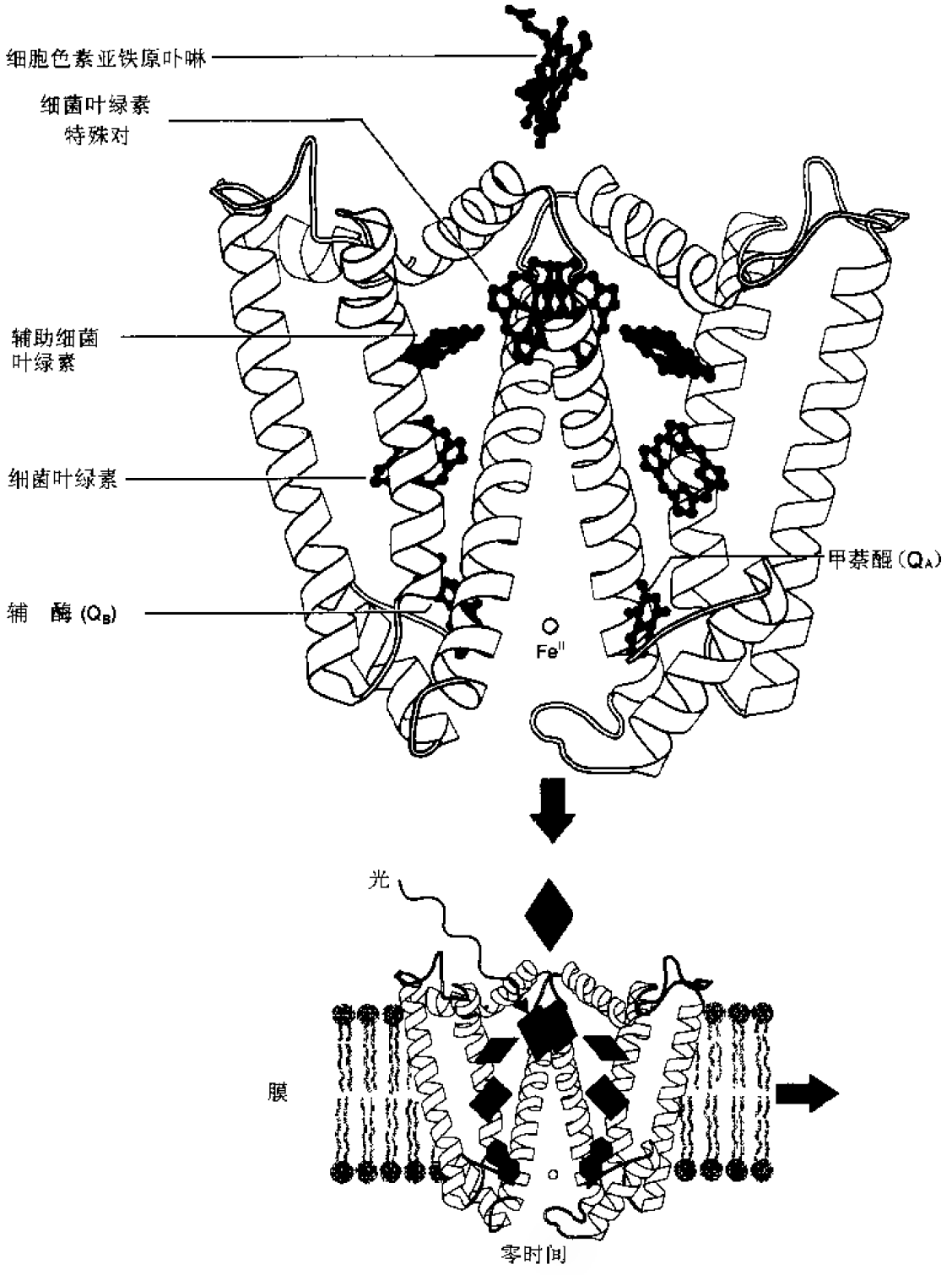


图 12.10 细胞色素 P-450$_{樟脑}$机理图解

底物双氧的解偶联还原途径


细胞色素亚铁原卟啉
细菌叶绿素
特殊对
辅助细菌
叶绿素
细菌叶绿素
甲萘醌 (Q_A)
辅　酶 (Q_B)
Fe^{II}
光
膜
零时间

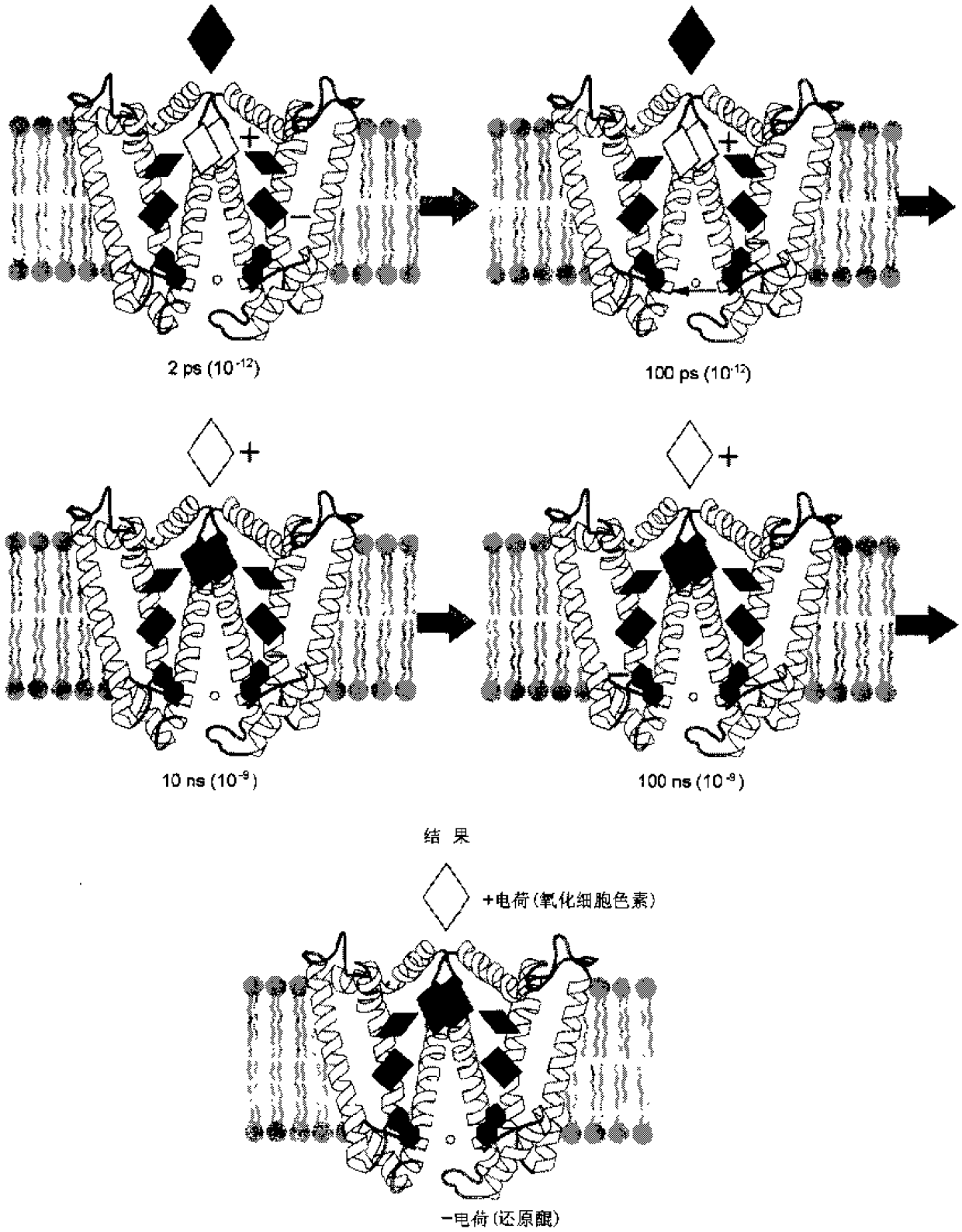


图 12.11　通过光合作用中心的电子转移造成电荷跨膜分离
在细胞膜一侧形成氧化态细胞色素，另一侧产生还原型醌类

的氢键。配位数的变化伴随着铁离子由低旋态变为高旋态。这些结果显示了铁氧化是如何与底物结合相偶合的。配位数、旋态及铁位点极性的变化提高了铁的氧还势，从而使三价铁的还原变得容易了。还原反应形成的开放性配位位点和还原态的铁离子又使得氧分子的结合得以发生（见 11.2.a）。一旦氧分子结合到中心上，通过一个与血红蛋白和肌球蛋白相似的机制，第二个电子加入到金属核心形成初始的高反应性形式。正常条件下，该中间产物中的 O—O 键被切断，释放出水和能水化底物的铁-oxo 中间体。水又取代氧化后的底物，完成反应循环。该反应要求底物在活性中心的正确的定位并消除所有可能的副反应，以保证所有电子都用于底物的水解。

有研究直接探索了在这个严密的偶合中底物和酶的调控作用。我们首先考虑底物，一种缺少羰基的樟脑的类似物为莰烷（camphane，$C_{10}H_{18}$），它同样能作为酶的底物。与樟脑类似，以莰烷作为底物的反应中 90%的水解产物都是 5-exo 异构体，但是樟脑氧化的效率为 100%，而综合考虑氧和还原剂的消耗后，樟脑的氧化效率仅为 8%。经晶体结构分析表明，莰烷与酶的配合物与樟脑配合物的不同可能是导致氧化效率差别的原因：首先，莰烷存在时活性中心的水分子仍然存在，甚至与铁离子结合的水分子也未被取代；其次，与酶结合的莰烷的活动性远远高于樟脑。这些差别使得高反应性的氧衍生物通过其他途径被消耗，如质子化还原后的氧分子而产生过氧化氢以及质子化铁-oxo 配合物产生水。这些反应的机制如图 12.10(p. 249)所示。

类似的去偶合现象可以由酶的改变而产生。在一种突变体中，将一个保守性的苏氨酸残基用 Ala 取代后，酶甚至在樟脑作为底物时也失去了偶合的功能。晶体结构显示，该残基参与固定和稳定活性中心，特别是在氧分子和底物都已结合到酶上时。这些结果表明，P-450 中存在多种精细调节机制，以有效地使活性中间物进入惟一的反应途径。

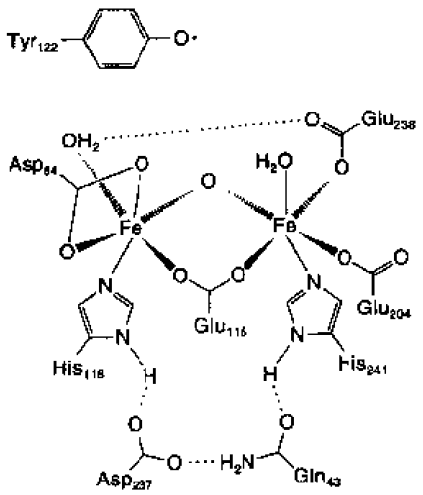
12.7.d 膜转移：光合反应中心

关于偶合的最后一个例子是细胞的光合反应中心，它偶合光能的吸收和跨膜电势差的形成。在第 9 章中，我们已经知道该反应中心包括排布在一个复杂的膜结合蛋白复合体中的一系列复杂的辅基。一对特定的叶绿素分子吸收一个光子后释放出一个电子。通过图 12.11(见 p. 250～251)所示的机制，该电子迅速地从一个辅基转移到另一个辅基，直到到达辅酶 Q_B。从结合电子的细胞色素中迅速地释放出电子到特定电子受体防止了电子的回流。一旦两个电子到达 Q_B，Q_B就被质子化形成氢醌（hydroquinone，对苯二酚 $C_6H_4(OH)_2$）。电子跨膜传递以及质子被用于形成氢醌导致了跨膜的电化学梯度的形成，而此电化学梯度又可以用于其他过程。对此系统来说，反应中心在膜中的定位是偶合的基础，如果没有隔开各个辅基的膜，电子将只会在醌酮中形成自循环。

有必要对其他一些膜结合系统（如高等植物中的光合器官，氧化磷酸化系统）进行进一步研究，以完全了解大自然所具有的偶合跨膜反应的策略。在最后一章中，我们将讨论包含此问题在内的一些生物无机化学的前沿问题。

习　题

1. 核糖核苷还原酶的活性位点结构如图，双铁中心被认为产生酪氨酸自由基之源。该中心首先还原成二价双铁形式，然后与双氧，Tyr-122，及其他电子源形成酶活性部位。讨论在该中心再生还原过程铁原子配位及修饰机理，及将出现怎样的特定变化。



2. 含铜蓝中心质体蓝素的蛋白中，电子传递速率可以较高，例如天青蛋白电子自我交换的速率常数为 $1.3\times10^{5}(mol/L)^{-1}\cdot s^{-1}$。这些位点具有相对少量配体重组能，由于氧化态和还原态的铜结构很类似，因此这一性质曾被认为是其反应速率高的主要原因。现在，CuL_2^{n+}络合物($n=1$ 或 2，L 为双齿配位体的顺吡唑基)已被合成。其结构为四面体，Cu(Ⅱ) 的 Cu—N 平均键长是1.96 Å，Cu(Ⅰ) 的 Cu—N 平均键长是2.03 Å。它的电子交换速率说明其自我转化常数低于 $10^{2}(mol/L)^{-1}\cdot s^{-1}$。讨论这一结果与天青蛋白的对比。
3. 早在 metazido 蚯蚓血红蛋白 X 射线结构测定中，电子密度图谱被错误地解释为双 Fe(Ⅲ) 中心由 oxo 桥连的结构模型；其中三个组氨酸与一个末端配位，而两个组氨酸和一个叠氮配体与另一个末端配位。这一结构与实际 metazido 血红蛋白相比有何不足之处(参考本章原理及第 11 章，图 11.4)？试讨论之。
4. 为构建微型含锌酶，仅缺乏末端组氨酸的类锌指肽被合成。此肽可结合 Zn(Ⅱ)、Co(Ⅱ)等金属产生 $M^{Ⅱ}(Cys)_2(His)(OH_2)$位点的络合物，结合的水分子可被其他配体所取代。欲用此络合物催化酯类的水解而未获成功，试分析其无催化活性的原因及提出可行的改进方法以使其具备催化活性。

参 考 文 献

蛋白侧链对功能的控制：开放的配位位点

H. Lauble, M. C. Kennedy, H. Beinert, and C. D. Stout. 1992. "Crystal Structures of Aconitase with Isocitrate and Nitroisocitrate Bound." *Biochemistry* 31, 2735~2748.

B. L. Vallee and D. S. Auld. 1990. "Active-Site Zinc Ligands and Activated H_2O of Zinc Enzymes." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 220~224.

L. Zheng, M. C. Kennedy, H. Beinert, and H. Zalkin. 1992. "Mutational Analysis of Active Site Residues in Pig Heart Aconitase." *J. Biol. Chem.* 267, 7895~7903.

配体类型与功能的控制

P. J. Boon, G. I. Tesser, and R. J. F. Nivard. 1979. "Semisynthetic Horse Heart [65-Homoserine] Cytochrome *c* from Three Fragments." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 61~65.

A. L. Raphael and H. B. Gray. 1991. "Semisynthesis of Axial-Ligand (Position 80) Mutants of Cytochrome c." *J. Am. Chem. Soc.* 113, 1038~1040.

S. Sligar, K. D. Egeberg, J. T. Sage, D. Morikis, and P. M. Champion. 1987. "Alteration of Heme Axial Ligands by Site-Directed Mutagenesis: A Cytochrome Becomes a Catalytic Demethylase." *J. Am. Chem. Soc.* 109, 7896~7897.

通过配体主体结构调节功能：铜蓝蛋白

T. P. J. Garret, D. J. Clingeleffer, J. M. Guss, S. J. Rogers, and H. C. Freeman. 1984. "The Crystal Structure of Poplar Apoplastocyanin at 1.8-Å Resolution." *J. Biol. Chem.* 259, 2822~2825.

J. M. Guss and H. C. Freeman. 1983. "Structure of Oxidized Poplar Plastocyanin at 1.6 Å Resolution." *J. Mol. Biol.* 169, 521~563.

J. M. Guss, P. R. Harrowell, M. Murata, V. A. Norris, and H. C. Freeman. 1986. "Crystal Structure Analyses of Reduced (Cv^1) Poplar Plastocyanin at Six pH Values." *J. Mol. Biol.* 192, 361~387.

对功能的间接控制

R. Langen, G. M. Jensen, U. Jacob, P. J. Stephens, and A. Warshel. 1992. "Protein Control of Iron-Sulfur Cluster Redox Potentials." *J. Biol. Chem.* 267, 25625~25627.

G. R. Moore. 1983. "Control of Redox Properties of Cytochrome *c* by Special Electrostatic Interactions." *FEBS Lett.* 161, 171~175.

K.K. Rodgers and S.G. Sligar. 1991. "Surface Electrostatics, Reduction Potentials, and the Internal Dielectric Constant of Proteins." *J. Am. Chem. Soc.* 113, 9419~9421.

M. A. Walters, J. C. Dewan, C. Min, and S. Pinto. 1991. "Models of Amide-Cysteine Hydrogen Bonding in Rubredoxin: Hydrogen Bonding Between Amide and Benzenethiolate in $[(CH_3)_3NCH_2CONH_2]_2[Co(SC_6H_5)_4] \cdot 1/2CH_3CN$ and $[(CH_3)_3NCH_2CONH_2][SC_6H_5]$." *Inorg. Chem.* 30, 2656~2662.

底物特异性

R. H. Burris. 1991. "Nitrogenases." *J. Biol. Chem.* 266, 9339~9342.

J. L. Johnson and K. V. Rajogopalan. 1977. "Tryptic Cleavage of Rat Liver Sulfite Oxidase—Isolation and Characterization of Molybdenum and Heme Domains." *J. Biol. Chem.* 252, 2017~2025.

R. Raag and T. L. Poulos. 1991. "Crystal Structures of Cytochrome $P\text{-}450_{CAM}$ Complexed with Camphane, Thiocamphor, and Adamantane: Factors Controlling P-450 Substrate Hydroxylation." *Biochemistry* 30, 2674~2684.

D. C. Youvan and B. L. Marrs. 1987. "Molecular Mechanisms of Photosynthesis." *Sci. Amer.* 256, 42~48.

第 13 章　生物无机化学前沿

13.1　金属离子的选择与摄取
13.2　金属离子浓度的控制与应用
13.3　金属与生物分子的折叠和交联
13.4　金属离子与生物分子的结合
13.5　电子转移蛋白
13.6　底物的结合与活化
13.7　原子和基团的转移化学
13.8　活性位置的蛋白质调控

贯穿本书第 5～12 章的讨论，我们尝试通过一些例子来描述生物无机化学的原理。通过对某些特定体系的直接和模型研究获得了大量信息，有些例子代表了几乎完美的研究领域。因为在这些研究领域中，即使还有没有达到的目标，也不再涉及生物无机化学方面的问题。而在另外一些例子中，要从分子水平理解生物无机化学的基础，还有大量的工作要做。回顾一下前面的讨论，我们不禁会问，该领域中哪些问题已经得到解决。最有说服力的例子有：(i)自然可逆地结合分子氧的方式；(ii)毒副产物，尤其是超氧化物离子是如何被消除的；(iii)电子转移蛋白质，尤其是含蓝铜或铁-硫中心的蛋白质的组成；(iv)锌在水解酶如羧肽酶中的作用。在如下几个方面已经取得了大的进展：在理解 B_{12} 辅酶均裂 Co—C 键化学方面，右选出铂抗癌药物的 DNA 结合性能方面，在推测自然摄取，配位和储存铁的途径方面，在解决金属调节蛋白如锌-指蛋白和钙调蛋白的结构方面，在处理细胞色素 P 450 羟基化化学的细节方面。然而，在每一个方面，还都有需要将来通过实验研究来解决的重要生物无机化学问题。此外，与这些例子有关的其他方面还了解的甚少。这些没有解决的问题代表了 20 世纪 90 年代中叶生物无机化学的前沿研究领域。有趣的是，在 20 年前发表的生物无机化学的第一篇重要论文中，这些前沿研究领域中的许多问题就被提了出来。包括如固氮酶，远距离电子转移蛋白，细胞色素氧化酶等重要的还没有全部了解的体系，以及一些最近才引起关注的问题，如镍在加氢酶和脲酶中的作用，锰在光系统 Ⅱ 的释氧体系和钼氧转移蛋白中的功能。

本章将简单地介绍一下生物无机化学中的这些前沿研究领域。一方面，我们希望通过介绍生物无机化学中的这些前沿研究领域，激发研究，解决这些人们关注的问题；另一方面就是使读者感受到该领域的巨大研究范围。本书的主旨是在第 5～12 章中所描述的生物无机化学原理，它比所讨论的每一个具体例子具有更长远的生命力。我们期望，为解决这些前沿问题所获得的知识将融入我们在讨论中所描述的各种各样的类型中。我们相应地安排本章的讨论，使其反映出前面几章的组织结构。

13.1 金属离子的选择与摄取

在一些分子细节上，我们只了解了细胞中金属铁离子是如何被摄取并被维持在一定浓度的。然而，在第5章中讨论过的肠杆菌素的发现使我们认识到，相关的配体可能发生进化，从而螯合铜、锰，甚至生物体可利用的所有金属离子。这种可选择体系的鉴定和表征是一个重要挑战。例如，最近对铜传输异常所导致的Menkes病的基因的分离和分析显示预测的蛋白含有膜跨越域和一个铜结合位置。这个发现充分证明生物无机化学在治疗人类疾病方面有重大贡献。而且，除了在表1.1中所列的金属离子以外，很有可能其他一些金属离子也将被发现是生物的必需元素。过渡金属中的主要候选者有Ti、Cr等。因为在几种海洋生物体中发现了Ti元素；Cr是和葡萄糖耐受因子以及糖尿病密切相关的，尽管对Cr的作用还有争议。随着有关这些金属离子的知识积累，对它们功能和体内平衡的研究也会开始。

有很多关于金属卟啉和铁-硫原子簇作为金属蛋白的生物无机元件的讨论。然而自然必须管理许多其他体系的组装，对此我们知之甚少。例如，Mo和Fe以及如固氮菌的Fe/Mo辅因子中的混合金属簇合物是如何组装的？与氧转移蛋白有关的Mo喋呤辅因子配合物的组装机制如何？有兴趣为金属蛋白活性位置建立模型的生物无机化学家，很有可能在寻找这些问题的答案过程中发挥主要作用。因为，这些问题的解决，和作为蛋白辅因子的光谱和功能模型的合成与研究有密切关系。

神经生物学是现代科学中的一个主要前沿领域。尽管碱金属离子在标记传导中发挥着重要作用，很有可能其他金属离子参与了神经生物性功能所要求的过程。最近的一篇报道指出，人脑中磁性粒子的存在，类似于磁致有规细菌以及蜜蜂和鸟类的导航机制中的磁性晶粒。一个相关的领域是在药物中利用金属离子控制神经行为；研究锂离子控制躁狂忧郁症的分子机制，是一个具有重要意义的前沿领域。生物无机化学家也将帮助弄清楚金属离子导致的神经毒性的分子机制、开发新的螯合试剂用于对付或除去这种毒性，并且为使用金属离子作为探针和药物的药学领域做出重大贡献。在最后的这个领域，我们尤其希望大家认识到，我们需要更好的金属配合物作为放射药物，通过核磁共振成像探测病变组织。另外，随着关于顺铂、auranofin和其他金属药物机制信息的继续积累，设计更为有效的方法来考察新化合物的药物活性将成为可能。

13.2 金属离子浓度的控制与应用

在过去的几年中，细胞内金属离子浓度的控制机制的研究取得了很大的进展。如在第5～6章讨论过的一样，积累了关于铁在原核生物和真核生物体系的大量信息；但是，重要的细节问题如铁蛋白核心的真实结构以及关于它的装载和卸载机制信息还不清楚。越来越多的证据表明，很多其他金属离子也有类似的体系。对基因的研究导致了许多原始突破。通过选择不能承受极高或极低的金属离子浓度的突变种，可能会接触到金属离子摄取、储存和解毒的必需蛋白。在体系的组织水平和在详细的分子水平对这些现象进行研究，将会获得激动人心卓有成效的结果。对一些金属，如Mo、Ni、Zn和Cu，已经获得了重要的初步研究结果。我们希望这些研究将为既存战略提供更多的例子，自然把这些既存战略用于金属离子摄取、解毒以及一些全新的机制。

另一个主要研究领域涉及到离子迁移系统和离子通道的详细结构表征。光合成反应中心

的晶体结构测定对研究光合成机制产生过深远影响。结构的确定证实了一些以前的想法并提供了新的生物物理实验框架。除此之外，它认可了一些新问题。若没有结构方面的知识，这些新问题是不可能得到人们的认识的。一旦测定了离子迁移物种和离子通道的第一个晶体结构，我们可以期待有更多类似的晶体结构被测定。将从低分辨结构研究方法如电子显微镜获得的信息，和从定点突变研究所获得的结果结合起来，从而产生系统的模型。已经证实这个路子是很有效的。然而，只有结合原子分辨或近似原子分辨结构数据，一些关于如金属离子选择性现象的假设才有可能得到解释。这是一些很有挑战性的问题。因为获得足够量的纯物质并得到合适的晶体是十分困难的。反过来说，成功的研究结果将大大推动该领域的发展。

最后，金属离子是如何参与细胞内外信息交流的，无论从任何方面来讲，还都没有得到圆满的解释。钙是迄今为止研究得最深最广的例子。如在第 7 章中提到的一样，在某些情况下，锌作为细胞信号或者信使的可能性尽管得到许多细节数据的支持，但还无法证实。另外，尽管金属离子本身并非信使，在细胞内信息交流网络中以金属离子为中心的体系也已经被发现。一个惊人的例子涉及到一氧化氮。这个分子曾经被认为仅仅是一个剧毒分子，但是后来发现它是一个重要的神经传输体，一种血管平滑肌松弛剂，一个和血小板解聚有关的因子。它的合成受到钙或钙调蛋白的调节，而它的受体是在鸟苷酸环化酶中的一个铁卟啉。鸟苷酸环化酶将鸟嘌呤三磷酸酯转化成环状鸟嘌呤单磷酸酯。这个信息为生物无机化学家提供了许多很有意义的研究课题。

13.3 金属与生物分子的折叠和交联

人们早就认识到金属离子折叠生物高分子的能力。但是，这种现象在生物学中的范围只到近年才受到人们的关注。类似于锌指蛋白，含有金属组织域的新型蛋白被快速地发现。预期这种进步将会继续下去并将扩展到没有很好表征的体系，如膜结合蛋白。

关于其他生物高分子，可期待更快的知识积累。金属离子作用的令人振奋的发现，例如钾和钠在端粒(telomere)中控制结构形成的发现，预示着对其他金属基的特殊 DNA 结构的阐明。RNA 的结构更是一个广阔领域。在 RNA 分子的复杂折叠中，存在着非专属和专属金属离子结合位置。这正在成为一个规则。利用晶体结构测定表征这些位置，或利用 NMR 方法研究 RNA，将在不久的将来揭示一些基本原理。

糖类也含有许多潜在的金属结合位置。糖类的详细三维结构以及金属离子在决定和调节这些结构中的作用，构成了一块未开拓的领域，也许它代表了 21 世纪生物无机化学中最伟大的前沿研究领域。在该领域的研究中已经有了重大发现。例如，已知某些外源凝聚素、糖类结合蛋白质需要金属离子(如钙)来结合。一个近期的晶体结构测定揭示了钙桥联蛋白和糖类基团。

最后，我们来谈一下生物矿物质和生物矿物质化。在第 6 章，我们简单地讨论了一个例子，即铁蛋白的铁核。还有几个已知的例子，包括磁致有规细菌的磁粒子核、某些微生物产生的镉硫粒子、当然还有在骨头和牙齿中发现的钙磷基物质。基于无机固体物的独特性质，这些物质能发挥各种各样的作用。钙基物质是复细胞生物维持骨骼完整必不可少的。另外，这些物质还是金属离子体内平衡系统的重要组成。这些生物矿物质的组装和反组装是复杂的，不仅仅涉及到无机化学组成，也涉及到与蛋白质的各种各样的相互作用。固态生物无机化学领域具有挑战性，在不远的将来应该有大的发展。

13.4 金属离子与生物分子的结合

对于金属生物分子进行的生物合成，选择正确的金属离子是很关键的。人们总是强调在这些反应中热力学控制的重要性，但是，一些明显的矛盾表明其他因素也可能很重要。例如，*E. coli* 产生两个独特的具有超氧化物歧化酶活性的多肽，其中一个含有铁离子，而另一个含有锰离子。蛋白质的结构十分相似，使得很难理解仅仅热力学因素能够允许一种金属离子结合到一种多肽上，而允许另一种金属离子结合到另一种多肽上。但是，这种矛盾使人推测蛋白质从相同的体系中结合金属离子。近期的研究表明，不同的多肽是在不同条件下生物合成的。因此，在铁超氧化物歧化酶多肽中可能发现铁。因为该多肽是在铁相当富集的情况下产生的。这种金属支持的基因调节体系和金属离子参与的热力学以及动力学之间的相互作用，应是一个硕果累累的研究领域。

一个相关的话题是在金属结合中辅助蛋白质参与的可能性。如在 13.2 节中提到那样，通过基因研究证实了许多有趣的发现。彻底地复原一些这样的体系，应该会对机制有更深刻的了解。通过这种机制金属离子插入到蛋白质中，在某些情况下结合不是自发进行的。

金属蛋白设计是另外一个刚刚开始发展的研究领域。通过加入或修饰氨基酸侧链、通过利用非天然氨基酸、或者通过尝试设计新型蛋白质，许多研究者企图将金属离子结合到既存蛋白质结构中。尽管还有很多问题有待解决，已经报道了一些令人振奋的成功例子。该领域中的一个例子涉及到在一个抗体的结合位置上建造一个金属结合位置。尽管已经表明与金属发生了结合，但金属是否真正地配位到指定的配体上还需做进一步的研究。另外，这样的金属位置是否能和与金属酶类似的方式发生反应还不清楚。

13.5 电子转移蛋白

在进行氧化还原反应时，有关单蛋白内结构的变化已有不少的知识积累，然而电子被从一个蛋白转移到另外一个蛋白的机制还有很多争议。具体地讲，距离、方向和推动力的作用，特别是决定电子转移速率的介质的本质还有待于做彻底的研究。为了解决这些问题，已经做了大量的理论工作，并且设计了许多奇妙的实验方法验证它们。遗憾的是，分离出这些因子中的任何一个并保持其余因子不变是极其困难的。另外，我们已知，蛋白-蛋白电子转移不仅仅涉及到蛋白-蛋白配合物也涉及到它的动力学。换句话说，电子转移是从蛋白-蛋白配合物较大范围内的一套构型开始发生的。电子是怎样从一个蛋白转移到另外一个蛋白的？虽然这是一个容易回答的问题，但很难回答清楚。在达到一个共识之前，还有很多工作要做。当该领域发展到对机理有真正的预见性了解时，将是十分激动人心的。重要的突破也许将要求发展新的物理或理论方法来研究电子转移现象。

13.6 底物的结合与活化

如在第 10 章所述，金属离子结合和活化底物的能力，对某些锌水解酶已经研究得相当透彻。通过利用定点突变方法确定催化机制中蛋白侧链的作用，并结合 X 射线晶体结构测定研究，随着有关其他体系的信息的不断积累，该领域应该有显著的进步。另外，生物无机化学家在制备这些酶，如碳酸酐酶中的锌核的功能模型方面表现出新的兴趣。该研究将会进一步推动该领域的发展。除锌之外，已知各种各样许多其他金属离子也能表现为结合和活化底物的中心。

一个例子就是催化尿水解的脲酶中公认的双核镍中心。近来对蛋白和模型化合物的机理研究的进展，有可能为描述在第10章所提出的原理提供更多的例子。

锌、镁可能还有锰作为DNA或RNA水解体系中催化剂或者辅助催化剂的研究进行得较少，但有可能成长为该分支领域中一个重要的成员。包括一些重要的酶，如磷酸酯酶和激酶，它们对于控制细胞增长极为关键，并被发现存在于癌细胞、催化RNA（核酶）、核酸内切酶与核酸外切酶、DNA与RNA聚合酶、区域异构化酶、以及与细胞对外部压力的总体反应有关的酶。最近有一个关于激酶C的例子。激酶C与信号传导有关，在人致由1个氮原子和3个硫原子所构成的配体环境中，结合着4个非桥联的锌离子。另外，还有一个关于*E. coli* DNA聚合酶I的例子。据推测，其中的一个羧基桥联的二价双金属中心，产生于涉及到3′-5′核酸外切酶催化机制的过渡态。一个相关的有趣发现是，证实了四膜虫核酶为金属酶，和有关的蛋白酶具有类似的机制特性。伴随着这些研究活动，模拟这些功能的模型化合物的研究应该得到发展。一个有关的目标是设计并合成人工核酸酶金属配合物。这种金属配合物能分辨DNA或RNA序列、形状和结构，并且在水解化学而不是氧化还原化学的帮助下切断磷酸二酯骨架。这种试剂的价值在于，它们产生的碎片有可能会重新结合，也许是酶催化的重新结合，从而改形具有原结构的多核苷酸。从这个角度来看，这些配合物起到了人工限制酶的作用。这种化学可能会对生物技术作出重要贡献，并且显著改善现有试剂。现有试剂利用氧化还原原理，像争光霉素一样，切断反应仅仅在核酸中产生非配位型的缺口。

13.7 原子和基团的转移化学

生物无机化学的一些主要成功涉及到电子转移和Lewis酸或Lewis碱两种反应都发生的反应。如在第11章所述，有这种功能的蛋白质包括血红蛋白和肌红蛋白、血蓝蛋白、超氧化物歧化酶以及单和双加氧酶。在超氧化物歧化酶中，双氧分子或其代谢物之一在一个金属中心得到处理。尽管在探明这些蛋白作用机制的细节上取得了成功，但是，该领域的许多重大生物无机化学问题还有待解决。

在12.7.b节中讨论过的固氮酶的MoFe蛋白是一个早已知道的体系。从这个蛋白中提取到了可溶性辅因子，含有大约7个Fe、1个Mo和8个无机S^{2-}离子以及高柠檬酸根离子。对这个可溶性辅因子的结构进行表征的尝试也在进行中。MoFe蛋白本身也已经被单晶化，并且晶体结构测定最近取得了进展，为辅因子位置的组成和立体化学提供模型。随着结构的确定和对分子氮活化中心的本质越来越多的了解，对固氮酶的深入研究以及合成模型化合物方面的研究将进行下去。某些固氮酶辅因子的Mo原子被V甚至Fe所取代的奇特发现，进一步刺激了该领域的研究工作。固氮酶将肯定继续占据生物无机化学的中心舞台，直至对自然系统的研究和MoFe蛋白的合成模型研究两个方面都有突破。

另外一个具有可比性和重要意义的酶是细胞色素*c*氧化酶。像固氮酶一样，细胞色素*c*氧化酶采用多金属中心来实施多电子转移反应，即用4个电子将氧分子还原成水。虽然已经有不少关于该酶中2个铜和2个血红素铁中心的本质的信息，包括通过细菌系统的定点突变研究而确定的一些特殊配体的知识，但是详细的结构还不清楚。物理、基因以及分子模型研究的进展，将可能为深入了解这个蛋白质提供重要的信息，包括它的结构、金属中心的相对位置和催化机制。在催化过程中释放的能量，是如何产生用来合成ATP的质子电化学梯度的，也是值得研究的有趣问题。

最近，通过晶体结构测定确定了亚硝酸盐还原酶的结构。亚硝酸盐还原酶是一种铜酶，它在土壤脱硝过程中将 NO_2^- 转变成 NO 并最终转变成 N_2。从结构分析所获得的信息，应该促进对该反应机制的详细研究。同理，对酶如加氢酶和血浆铜蓝蛋白的晶体结构分析，应该促进反应机制方面的信息积累。在这些有趣的金属酶中，原子和基团转移反应起着中心作用。非血红素二铁酶体系甲烷单加氧酶代表了另外一个前沿研究领域。该领域具有多方面的研究方向，如环境的生物补救中使用 MMOs，羟化酶如何结合并活化甲烷，甲烷作为燃料和碳氢化物源的重要性，对羟基化化学的兴趣，尤其是与相关的血红素酶细胞色素 P-450 的比较。

一个几乎没有研究过的领域是金属酶在糖新陈代谢中作用。包括的体系如木糖异构酶，这里一个钴或镁中心负责将一个 2-羟醛转变成 1-羟基-2-酮，以及其他金属异构酶。生物中有三类主要的聚合物：蛋白质、核酸和碳水化合物。考虑到生物无机化学家在前面两类金属促进反应方面的研究活动，我们会很吃惊地发现几乎没有关于第三类的研究。金属-糖化学将给蛋白质化学家和模型研究化学家提供很多的机会。

13.8 活性位置的蛋白质调控

在第 12 章中我们看到，根据配位数、配位到该单元的配体选择、局部结构和介电变化、以及周围蛋白域所贡献的底物结合单元，相同的金属中心是如何被置于各种不同蛋白质中而发挥不同作用的。如我们在本章已经提到过的体系的特性一样，比如，固氮酶(FeMo 辅因子)、MMO (双铁中心)、加氢酶 (Fe_4S_4 原子簇)、脲酶(双镍中心)、激酶与磷酸酯酶(锌中心)，蛋白质环境对这些生物无机元件的调节是这些体系的特性之一。在一个膜内安置多个不同的中心所产生的蛋白质行为的偶合，构成了涉及到活性位置调节的另外一个重要前沿研究领域。探明光系统 II 的释氧配合物(OEC)的详细过程，也许是目前最具有挑战性的问题。该系统中 4 个光还原的锰离子将水转化为双氧。最近所关注的问题包括，在催化中心中锰离子的实际数目、在各种光还原态锰离子的氧化水平、氧-氧键形成态、中心中其他氧化还原活性组分的作用、以及蛋白质环境在控制氧化还原过程中作用。该系统还具有如下的特性，钙和氯离子的参与，辅因子如叶绿素反应中心，一个公认的酪氨酰自由基的介入以及反应中心化学与质子释放的偶联。这进一步表明该系统错综复杂。为了取得较大的进展，不同研究小组各方面专家的合作是必要的。他们包括遗传学家、光物理学家、理论化学家、生物物理化学家、无机化学家、生物化学家以及从事模型化合物合成的研究者。他们献身于生物无机化学的研究中，向诸如 OEC 这样的重大问题挑战。

前段提到过在 OEC 中可能涉及到酪氨酰自由基。这使我们想到这种单元的鉴定，因为和咪唑自由基一样，它们都是一些金属酶的重要组成。它们包括，如在 11.4.c 节中讨论过的核糖核苷酸还原酶的亚单位，它含有在酶机制中探测到的稳定酪氨酰自由基；如细胞色素 c 过氧化酶，在其中距铁原子≈5 Å 形成色氨酸自由基；以及半乳糖氧化酶，它是一个铜酶，含有半胱氨酸修饰的酪氨酰自由基配体。最后一个是其中的氨基酸在蛋白质转译后被修饰的体系，这样的体系越来越多。这种转译后修饰是自然调节金属酶活性点的另一种途径，它扩大配体供体和活性位置氨基酸区域，从而获得特殊功能。酪氨酸、色氨酸和其他自由基是如何与附近金属离子协同工作的，或者是如何帮助调制附近金属离子的性质的，对这个问题的了解是生物无机化学中具有挑战性和重要意义的前沿研究领域之一。

习　题

请另外提出生物无机化学两个前沿研究领域。

参 考 文 献

生物无机化学的经典工作

G. L. Eichhorn, ed. 1973. *Inorganic Biochemistry*, Volumes 1 and 2. Elsevier, Amsterdam.

金属离子的选择和摄取

M. J. Abrams and B. A. Murrer, 1993. "Metal Compounds in Diagnosis and Therapy." *Science* 261, 725~730.

M. Barinaga. 1992. "Giving Personal Magnetism a Whole New Meaning." *Science* 256, 967.

M. P. Blaustein. 1988. "Cellular Calcium: Nervous System." in B. E. C. Nordin, ed., *Calcium in Human Biology*. Springer-Verlag, London, 339~366.

K. Davis. 1993. "Cloning the Menkes Disease Gene." *Nature* 361, 98.

S. A. Hinton and D. Dean. 1990. "Biogenesis of Molybdenum Cofactors." *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 17, 169~188.

K. J. Skinner. 1991. "The Chemistry of Learning and Memory." *C & E News* 69, 24~41.

金属离子浓度的控制和利用

D. S. Bredt, P. M. Hwang, C. E. Glatt, C. Lowenstein, R. R. Reed, and S. H. Snyder. 1991. "Cloned and Expressed Nitric Oxide Synthase Structurally Resembles Cytochrome P-450 Reductase." *Nature* 351, 714~718.

H. L. Drake. 1988. "Biological Transport of Nickel," in J. R. Lancaster, Jr., ed., *The Bioinorganic Chemistry of Nickel*. VCH Publishers, Weinheim, 111~139.

C. A. Goode, C. T. Dinh, and M. C. Linder. 1989. "Mechanism of Copper Transport and Delivery in Mammals: Review and Recent Findings," in C. Kies, ed., *Copper Bioavailability and Metabolism*. Plenum Press, New York, 131~144.

E. D. Harris and S. S. Percival. 1989. "Copper Transport: Insights into a Ceruloplasmin-Based Delivery System," in C. Kies, ed., *Proceedings of the ACS Symposium on Copper Bioavailability and Metabolism*. Plenum Press, New York, 95~102.

E. Hubbard. 1989. "Metal Transport," in M. N. Hughes and R. K. Poole, eds., *Metals and Micro-Organisms*. Chapman and Hall, New York, 93~140.

T. V. O'Halloran. 1993. "Transition Metals in Control of Gene Expression." *Science* 261, 715~725.

S. Silver and P. Jasper. 1977. "Manganese Transport in Microorganisms," in E. D. Weinberg, ed., *Microorganisms and Minerals*. Marcel Dekker, New York, 105~149.

S. H. Snyder and D. S. Bredt. 1992. "Biological Roles of Nitric Oxide." *Sci. Amer.* 266, 68~77.

T. G. Traylor and V. S. Sharma. 1992. "Why NO?" *Biochemistry* 31, 2847~2849.

金属与生物分子的折叠与交联

R. J. Doyle. 1989. "How Cell Walls of Gram-Positive Bacteria Interact with Metal Ions," in T. J. Beveridge and R. J. Doyle, eds., *Metal Ions and Bacteria*. Wiley-Interscience, New York, 275~294.

F. G. Ferris, W. Shotyk, and W. S. Fyfe. 1989. "Mineral Formation and Decomposition by Microorganisms," in T. J. Beveridge and R. J. Doyle, eds., *Metal Ions and Bacteria*. Wiley Interscience, New York, 413~442.

A. M. Pyle and J. K. Barton. 1990. "Probing Nucleic Acids with Transition Metal Complexes," in S. J. Lippard, ed., *Progress in Inorganic Chemistry*, vol. 38. Wiley-Interscience, New York, 413~475.
E. D. Weinberg, ed. 1977. *Microorganisms and Minerals*. Marcel Dekker, New York.

金属离子与生物分子的结合

H. M. Hassan and C. S. Moody. 1986. "Regulation of the Biosynthesis of Superoxide Dismutase in Procaryotes," in G. Rotilio, ed., *Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology, and Medicine* Elsevier, Amsterdam, 274~279.
B. L. Iverson and R. A. Lerner. 1989. "Sequence-Specific Peptide Cleavage Catalyzed by an Antibody." *Science* 243, 1184~1188.
A.-F. Miller and W. H. Orme-Johnson. 1992. "The Dependence on Iron Availability of Allocation of Iron to Nitrogenase Components in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*." *J. Biol. Chem.* 267, 9398~9408.
R. N. Pau. 1989. "Nitrogenases Without Molybdenum." *TIBS* 14, 183~186.
S. Y. R. Pugh and I. Fridovich. 1986. "Introduction of Superoxide Dismutase in *Escherichia coli B* by Metal Chelating Agents," in G. Rotilio, ed., *Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology, and Medicine*. Elsevier, Amsterdam, 280~286.

电子转移蛋白

J. Bolton, N. Mataga, and G. McLendon, eds. 1991. *Electron Transfer in Inorganic, Organic, and Biological Systems*, in ACS *Advances in Chemistry*, Volume 228. American Chemical Society, Washington, DC.
M. K. Johnson, R. B. King, D. M. Kurtz, Jr., C. Kutal, M. L. Norton, and R. A. Scott, eds. 1990. *Electron Transfer in Biology and the Solid State: Inorganic Compounds with Unusual Properties*, in ACS *Advances in Chemistry*, Volume 226. American Chemical Society, Washington, DC.

底物的结合与活化

J. A. Piccirilli, J. S. Vyle, M. H. Caruthers, and T. R. Cech. 1993. "Metal Ion Catalysis in the *Tetrahymena* Ribozyme Reaction." *Nature* 361, 85~88.
A. M. Pyle. 1993. "Ribozymes: A Distinct Class of Metalloenzymes." *Science* 261, 709~714.

原子和基团的转移化学

A. Boussac and A. W. Rutherford. 1988. "S-State Formation After Ca^{2+} Depletion in the Photosystem II Oxygen-Evolving Complex." *Chem. Scripta* 28A, 123~126.
G. C. Dismukes. 1988. "The Spectroscopically Derived Structure of the Manganese Site for Photosynthetic Water Oxidization and a Proposal for the Protein-Binding Sites for Calcium and Manganese." *Chem. Scripta* 28A, 99~104.
V. Förster and W. Junge. 1988. "Protolytic Reactions of the Photosynthetic Water Oxidase in the Absence and in the Presence of Added Ligands." *Chem. Scripta* 28A, 111~116.
N. Ito, S. E. V. Phillips, C. Stevens, Z. B. Ogel, M. J. McPherson, J. N. Keen, K. D. S. Yadav, and P. F. Knowles. 1991. "Novel Thioether Bond Revealed by a 1.7 Å Crystal Structure of Galactose Oxidase." *Nature* 350, 87~90.

G. Palmer. 1987. "Cytochrome Oxidase: A Perspective." *Pure and App. Chem.* 59, 749~758.
G. Renger. 1988. "On the Mechanism of Photosynthetic Water Oxidation to Diooxygen." *Chem. Scripta* 28A, 105~109.
B. E. Smith and R. R. Eady. 1992. "Metalloclusters of the Nitrogenases." *Eur. J. Biochem.* 205, 1~15.

活性位置的蛋白质调控

B. A. Barry and G. T. Babcock. 1988. "Characterization of the Tyrosine Radical Involved in Photosynthetic Oxygen Evolution." *Chem. Scripta* 28A, 117~122.
A. Boussac and A. W. Rutherford. 1988. "S-State Formation After Ca^{2+} Depletion in the Photosystem II Oxygen-Evolving Complex." *Chem. Scripta* 28A, 123~126.
G. C. Dismukes. 1988. "The Spectroscopically Derived Structure of the Manganese Site for Photosynthetic Water Oxidization and a Proposal for the Protein-Binding Sites for Calcium and Manganese." *Chem. Scripta* 28A, 99~104.
V. Förster and W. Junge. 1988. "Protolytic Reactions of the Photosynthetic Water Oxidase in the Absence and in the Presence of Added Ligands." *Chem. Scripta* 28A, 111~116.
N. Ito, S. E. V. Phillips, C. Stevens, Z. B. Ogel, M. J. McPherson, J. N. Keen, K. D. S. Yadav, and P. F. Knowles. 1991. "Novel Thioether Bond Revealed by a 1.7 Å Crystal Structure of Galactose Oxidase." *Nature* 350, 87~90.
G. Renger. 1988. "On the Mechanism of Photosynthetic Water Oxidation to Dioxygen." *Chem. Scripta* 28A, 105~109.